INSULINSEKRETIONSSTUDIEN AN PERIFUNDIERTEN INSELN

Die Wirkung von Glukose, Theophyllin und Pyruvat

Angelika Magerl

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR : PROFESSOR DR. E.BUCHBORN

INSULINSEKRETIONSSTUDIEN AN PERIFUNDIERTEN INSELN. DIE WIRKUNG VON GLUKOSE, THEOPHYLLIN UND PYRUVAT.

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

ANGELIKA MAGERL

AUS MÜNCHEN

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz.Dr. R.Landgraf
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr. W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	6.3.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0028

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Regulation der Insulinsekretion	1
1.2.	Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion der Langerhans'schen Inseln und deren methodische Schwierigkeiten	7
1.3.	Zweck dieser Arbeit	9
2.	METHODIK	10
2.1.	Material	10
2.2.	Isolation der Langerhans'schen Inseln	10
2.2.1.	Tiere	10
2.2.2.	Anästhesie und Vorbehandlung	11
2.2.3.	Operation	12
2.2.4.	Weiterverarbeitung und Kollagenase-verdauung	14
2.3.	Versuchsaufbau und Durchführung der Perifusion	16
2.3.1.	Versuchsaufbau	16
2.3.2.	Experimentelles Vorgehen bei der Perifusion	18
2.3.2.1.	Oxygenierung der Perifusionslösung und Konstanthaltung des pH	18
2.3.2.2.	Umschaltventil	19
2.3.2.3.	Perifusion der Pankreasinseln	22
2.3.2.4.	Experimentelle Durchführung der Perifusion	23
2.4.	Zusammensetzung der Perifusionslösungen	24
2.5.	Insulin-Radioimmunoassay	25
2.6.	Auswertung der Ergebnisse	26
3.	ERGEBNISSE	27
3.1.	Einleitende Bemerkungen	27
3.2.	Vorbehandlung der Inseln mit verschiedenen Glukosekonzentrationen	28
3.2.1.	Zugabe von 5 mM Glukose zum Präparationsmedium	29
3.2.2.	Zugabe von 10 mM Glukose zum Präparationsmedium	30

		Seite
3.2.3.	Zugabe von 40 mM Glukose zum Präparationsmedium	32
3.3.	Vorbehandlung der Inseln mit 5 mM Theophyllin	33
3.3.1.	Stimulation mit Glukoselösungen	33
3.3.2.	Stimulation mit Glukoselösungen plus 5 mM Theophyllin	35
3.4.	Vorbehandlung der Inseln mit 5 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin	36
3.5.	Vorbehandlung der Inseln mit Pyruvat	37
4.	DISKUSSION	39
4.1.	Glukose-induzierte Insulinsekretion	39
4.2.	Einfluß von Theophyllin auf die Insulinsekretion	42
4.3.	Einfluß von Pyruvat auf die Insulinsekretion	45
5.	ZUSAMMENFASSUNG	46
6.	LITERATURVERZEICHNIS	47

1. EINLEITUNG

1.1. Regulation der Insulinsekretion

In Deutschland leiden etwa 2-3% der Gesamtbevölkerung an klinisch manifestem Diabetes mellitus, wobei sich nicht nur die Zahl der Altersdiabetiker weiter erhöht, sondern auch zunehmend Jugendliche von dieser Krankheit befallen werden. Aus einer Todesursachenstatistik von 1969 geht hervor, daß der Diabetes mit seinen zahlreichen Folgeerkrankungen an 9. Stelle der häufigsten Todesursachen in der BRD steht (1).

Während das Krankheitsbild selbst schon sehr lange bekannt ist, begann sich das Dunkel um die Ursachen dieser Stoffwechselstörung erst im letzten Jahrhundert zu lichten: 1869 entdeckte LANGERHANS (2) die Pankreasinseln und 20 Jahre später konnten MEHRING und MINKOWSKI (3) die Bedeutung der Bauchspeicheldrüse für den Zuckerstoffwechsel nachweisen, indem sie bei Hunden durch totale Pankreatektomie einen Diabetes mellitus hervorriefen. LAGUESSE (4) entdeckte, daß ein dafür verantwortliches Hormon in den von LANGERHANS gefundenen Inseln produziert wird. Den endgültigen Beweis für die Bedeutung von Insulin für den Diabetes mellitus erbrachten BANTING und BEST (5). Eine genaue Analyse des Hormons mit Ermittlung der Aminosäuresequenz gelang SANGER 1959 (6).

Weitere intensive Forschungen beschäftigten sich mit den vielseitigen Wechselwirkungen des Insulins im Zucker-, Fett- und Proteinstoffwechsel und der damit verbundenen Störungen beim Diabetiker. CERASI und LUFT (7) wiesen den eindeutigen Zusammenhang zwischen Insulinsekretion und Blutzuckerspiegel nach. Durch Messung von Blutzucker und Seruminsulin während kontinuierlicher Glukose-Infusion konnten sie feststellen, daß bei Diabetikern im Vergleich zu Gesunden die initiale Insulinsekretion verzögert eintritt und daß die Gesamtsekretion meist vermindert ist. Damit ergibt sich als Ursache des Diabetes mellitus eine nicht ausreichende Insulinsekretion bei relativem oder absolutem Insulinmangel.

Genauere Erforschung der Inseln im Tierexperiment durch DUNN et al. (8) zeigten, daß die beta-Zellen der Pankreasinsel die entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Diabetes mellitus spielen. Durch selektive Schädigung dieser Zellen mit Alloxan gelang es nämlich, einen Diabetes zu erzeugen und damit die Insulinsynthese und -freisetzung zu lokalisieren.

Der Stoffwechsel in der beta-Zelle ist vielfältig, wobei die Glukose eine Schlüsselstellung einnimmt. Dabei scheint die Glykolyse in der Glukoseutilisation zu überwiegen. Die Glukoseoxidation steigt sigmoidal zur Glukosekonzentration. Bei funktionellen Anforderungsschwankungen adaptiert sich der Glukosemetabolismus (9). Davon wiederum abhängig ist der Energiebedarf in der beta-Zelle. Eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium hat eine Stimulation der Zellatmung zur Folge. Die erhöhte Respiration scheint ausschließlich zur Glukoseoxidation verwendet zu werden, da die ATP-Konzentration ebenfalls ansteigt. Für die Insulinsekretion ist ATP notwendig, da eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Anoxie oder Dinitrophenol die Insulinfreisetzung blockiert. Weiterhin verhindert Antimycin A in einer Konzentration, die die Zellatmung völlig blockiert, die Umwandlung von Proinsulin in Insulin, möglicherweise durch eine Blockade des Proinsulintransportes zum Golgi-Apparat (9).

Die genaue Energieabhängigkeit der einzelnen Schritte der Insulinsekretion kann erst im Zusammenhang mit einem weiteren zentralen Problem, nämlich der Aufklärung des Sekretionsmechanismus, geklärt werden. Interessant sind dabei vor allem die Fragen, welche Substanzen sich positiv oder negativ auf die Hormonsekretion auswirken, wie die beta-Zelle diese Substanzen erkennt und wie die Transformation zur Sekretionsauslösung erfolgt. Dieser Komplex wird unter dem Begriff "stimulus-secretion-coupling" zusammengefaßt. Im Rahmen der Untersuchungen dieses Problems entwickelten sich zwei Theorien: Während bei der Stoffwechseltheorie die Metabolisierung eines Stimulus in der Zelle als Voraussetzung für dessen Wirksamkeit postuliert wird, vermutet man bei der Rezeptor-

theorie spezifische Rezeptoren an oder in der Plasmamembran der beta-Zelle, die durch Bindung des Stimulus und die daraus resultierende Veränderung der Zellmembran und des Ionenflusses die Insulinsekretion aktivieren.

Für die erste Theorie sprachen Untersuchungen von GRODSKY et al. (10), die ergaben, daß nur metabolisierbare Zucker wie Glukose, Fruktose oder Mannose zu einer Insulinfreisetzung führen. Weiter stellten ASHCROFT et al (11) fest, daß einige Glukosemetaboliten wie Glyceraldehyd oder Co-Faktoren wie NADP/H die Insulinsekretion stimulieren. Durch Zugabe von Mannoheptulose, das die Glukose-6-Phosphotransferasen hemmt, konnte, wie COORE und RANDLE zeigten (12,13), die Insulinsekretion inhibiert werden. ASHCROFT et al. (14) konnten weiterhin nachweisen, daß die Zugabe von insulinsekretionsfördernden Substanzen die Glukoseoxidation in den Pankreasinseln steigert. Sowohl MATSCHINSKY und ELLERMAN (15) als auch IDAHL (16,17) stellten einen Anstieg von Glukosemetaboliten parallel zur Glukose-induzierten Insulinsekretion fest, was ebenfalls für die Stoffwechseltheorie sprach.

Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen von MATSCHINSKY et al. (18), die besagen, daß bei Glukose-induzierter Insulinsekretion zwar die intrazelluläre Glukosekonzentration der beta-Zelle sofort stark ansteigt, die Konzentration verschiedener Metaboliten der Glykolyse aber gleichbleibt. Die Feststellung, daß auch Galaktose, ein nicht metabolisierbarer Zucker, Insulin freisetzen kann (19) - Untersuchungen von ASHCROFT und CROSSLEY (20) scheinen dem allerdings zu widersprechen- läßt einen anderen Mechanismus der Stimuluserkennung vermuten. Auch die Tatsache, daß Substanzen, die den Glukosetransport hemmen, keinen negativen Einfluß auf die Insulinsekretion haben (21), spricht gegen die Stoffwechseltheorie. So postulieren MATSCHINSKY et al. (18) in der Glukorezeptorhypothese spezifische Rezeptoren, vermutlich in der Membran der beta-Zelle, die nach Erkennung des Stimulus Änderungen in der Zellmembran herbeiführen und durch geeignete Mediatoren das Signal zur Insulinfreisetzung geben. Dabei scheinen mindestens zwei Arten von Rezeptoren eine Rolle zu spielen:

erstens ein hochspezifischer Rezeptor für Glukose; zweitens ein Rezeptor, der auch andere Zucker akzeptiert. Ein dritter Rezeptor - er könnte aber mit dem ersten identisch sein - wird durch Glukose für andere Stimulantien aktiviert (22).

Als Bindeglied zwischen Stimuluserkennung und Transformation in ein sekretionsauslösendes Signal ("Trigger") spielt zweifellos das Kalzium eine wichtige Rolle, das während der Glukosestimulation intrazellulär angereichert wird (23).

Die Anwesenheit von Kalzium im Medium ist für die Insulinfreisetzung erforderlich (24). Im kalziumfreien Medium erfolgt keine Glukose-induzierte Hormonsekretion (25,26). Eine Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt eine Steigerung der Insulinfreisetzung(27,28), was auf eine durch Glukose stimulierte Kalziumaufnahme in die beta-Zelle zurückzuführen sein dürfte (23,29). Experimente mit Ionophoren - Antibiotika mit Carboxylanteil, von denen bekannt ist, daß sie Kalzium ins Zellinnere transportieren - konnten die Rolle des extrazellulären Kalziums näher beleuchten. So konnte gezeigt werden (30), daß Ionophoren eine Erhöhung des zytosolischen Kalziums und damit eine anhaltende Insulinsekretion auch in Abwesenheit von Glukose hervorrufen. Mit diesen Ionophoren konnte auch in Medien mit niedrigem oder fehlendem Kalziumgehalt eine Insulinsekretion erzeugt werden, was auf einen Kalziumefflux und nachfolgenden Influx schließen läßt (31,32,33).

Experimente mit Somatostatin, das Kalzium inaktiviert oder bindet, zeigten dessen hemmenden Einfluß auf die Insulinfreisetzung mit Verbesserung durch Kalziumzugabe (34,35). Weiterhin hemmen Kalziumantagonisten die Glukose-induzierte Insulinsekretion (36,37,38).

Der Wichtigkeit des Kalziums scheinen zwei Mechanismen zugrundezuliegen (35,39,40): Einmal ein durch Glukose bedingter Anstieg des Kalziumgehaltes der Zelle, zum andern die Umverteilung des Kalziums intrazellulär, was möglicherweise durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg gesteuert wird. Glukose stimuliert dabei den Kalziuminflux (35,40), verhindert aber

größtenteils den Kalziumauswärtstransport (39). Dieser Prozeß benötigt offenbar Energie und ist damit abhängig von einem intakten Glukosemetabolismus. Insgesamt entscheidend ist nach MALAISSE et al. (39,41) in jedem Fall die Höhe der zytosolischen Kalziumkonzentration, wobei eine Umverteilung von einem granulären in einen zytosolischen Pool z.B. durch Theophyllin erreicht werden kann. Anhand dieser Ergebnisse entstand die Hypothese (42-54), daß Kalzium zu einer Aktivierung des mikrotubulär-mikrofilamentären Systems in der beta-Zelle führt, wobei es schließlich zur Emiozytose der insulinenthaltenden Granula kommt. Diese Theorie wird durch die Tatsache untermauert, daß Mitosehemmstoffe in der Lage sind, durch Schädigung der Mikrofilamente die Glukose-induzierte Insulinausschüttung zu hemmen (42,50).

Neben der Anwesenheit von Kalzium sind wie bei allen Vorgängen an Zellmembranen Natrium und Kalium von Bedeutung. Den Natriumausstrom aus der Zelle scheinen dabei zwei getrennte Pumpen zu regeln (55), wobei die erste kalium-, die zweite kalziumabhängig ist. Bei der letzteren soll entweder ein niedriger extrazellulärer oder ein hoher intrazellulärer Natriumgehalt über eine vergrößerte Kalziumaufnahme zur Insulinsekretion führen. Der transmembranale Ionenfluß verursacht über eine Depolarisation der Zelle elektrische Aktivität, die gemessen werden kann. DEAN et al. (56), PACE et al. (57) sowie ATWATER und MEISSNER (58) stellten fest, daß rhythmische Polarisationen von stimulierten Inseln parallel mit der Insulinsekretion verlaufen.

Eine entscheidende Rolle im Insulinsekretionsmechanismus scheint weiterhin dem zyklischen AMP zuzukommen. MONTAGUE und COOK (59) konnten ebenso wie ZAWALICH et al. (60) eine Erhöhung des cAMP-Spiegels parallel zur Glukose-induzierten Insulinfreisetzung nachweisen. Auch für GRILL und CERASI (61,62) ist die cAMP-Erzeugung durch Glukose einer der ersten Schritte der Signalumwandlung im Sekretionsmechanismus. BASABE et al. (63) provozierten durch einminütige Zugabe von cAMP zum Medium einen sofortigen kurzzeitigen hohen Anstieg der Insulinsekretion. Weiterhin zeigten sie, daß durch Diazoxid nur die Glukose-

induzierte Insulinausschüttung blockiert wurde, nicht aber die durch cAMP, Glukagon oder Theophyllin bedingte. Dies führte zu der Annahme, daß hier ein anderer Sekretionsmechanismus vorliegen müsse. Substanzen wie Glukagon oder auch Corticotropine erhöhen über Stimulation der Adenylatzyklase das zyklische AMP (64,65), während Tolbutamid oder Methylxanthine wie Coffein und Theophyllin durch Hemmung der Phosphodiesteraseaktivität zu einem Anstieg der cAMP führen (63,66,67,68,69). Alle genannten Substanzen haben eine gesteigerte Insulinsekretion zur Folge, wobei allerdings zur optimalen Freisetzung eine höhere Glukosekonzentration im Medium erforderlich ist (70-75). CHARLES et al. (74) zeigten sogar, daß cAMP allein nicht in der Lage ist, beide Insulinsekretionsphasen zu stimulieren. Substanzen, die die Konzentration von cAMP in der Zelle senken, bewirken einen Abfall der Glukose-induzierten Insulinsekretion (76,77). ZAWALICH et al. (60) entwickelten ein Modell des Insulinsekretionsmechanismus, wobei unter Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium der erhöhten Adenylatzyklaseaktivität die entscheidende Bedeutung zukommt. Insulin bewirkt dabei wahrscheinlich in einem "feedback" eine Senkung der cAMP-Konzentration und wirkt so der weiteren Insulinsekretion entgegen. Die Rolle des extrazellulären Kalziums hinsichtlich des cAMP ist umstritten. So stellten CAPITO und HEDESKOV fest (78), daß freies Kalzium die Aktivität der Adenylatzyklase hemmt, während Glukose, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat dieses Enzym direkt aktivieren und so eine Erhöhung des cAMP bewirken. Die Biosynthese von Insulin,wie überhaupt die Proteinsynthese, wird durch cAMP gefördert. Weiterhin existiert in der beta-Zelle eine cAMP-abhängige Proteinphosphokinase, die wahrscheinlich über die Phosphorylierung eines insulinären Proteins sowohl den Glukosemetabolismus kontrolliert als auch die zelluläre Kalziumverteilung beeinflußt (79). Diese Kalziumtranslokation (s.o.) bewirkt über die Aktivierung der Mikrofilamente die Emiozytose von Insulin. TOMITA und SCARPELLI (80) vermuten den Sitz des Adenylatzyklase-cAMP-Systems in der Zellmembran. Eine intakte Zellmembran ist deshalb Voraussetzung für das Studium von Sekretionsvorgängen.

1.2. Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion der Langerhans'schen Inseln und deren methodische Schwierigkeiten

Zieht man in Betracht, daß bei Säugern die wahllos im Pankreas zerstreut liegenden Langerhans'schen Inseln nur etwa 1% des gesamten Organgewichts ausmachen (81) und daß von diesem wiederum nur 60-80% beta-Zellen sind, werden die Schwierigkeiten der morphologischen Betrachtung und Erforschung deutlich.

Zum Studium der Insulinsekretion bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Für die Erforschung der menschlichen beta-Zelle können nur einfach durchzuführende in-vivo-Experimente herangezogen werden. Die Schwierigkeit liegt hier darin, daß die beta-Zelle auch der physiologischen Beeinflussung, etwa durch gastro-intestinale Hormone, Neurotransmitter oder vaskulär aktive Substanzen, unterliegt. Außerdem wird das Insulin dem natürlichen Abbau in Leber und Niere unterworfen oder ins periphere Gewebe transportiert, sodaß eine direkte Beurteilung der beta-Zell-Funktion nicht möglich ist. Besser zu verwerten sind Daten von in-vitro-Studien. Die einfachste dieser in-vitro-Methoden ist die Inkubation von Pankreasstückchen (82). Allerdings muß hier die Zerstörung des sezernierten Insulins durch Proteasen des exokrinen Gewebes durch Beifügen von Proteaseninhibitoren und insulinbindende Antikörper verhindert werden. Eine weitere in-vitro-Methode stellt die Technik der Pankreasperfusion dar, wobei das Pankreas mitsamt seiner Nachbarorgane schonend aus dem Tierkörper entnommen und auf möglichst physiologische Weise stimuliert wird (83). Hier bleibt zwar die Integrität des Gewebes erhalten, und die Durchströmungsverhältnisse entsprechen in etwa den natürlichen, doch sind im Versuchssystem das gesamte exokrine Pankreas sowie Magen und Teile des Duodenums mit allen Möglichkeiten der Beeinflussung enthalten. Erst eine dritte Methode, nämlich die Untersuchung der einzelnen isolierten Langerhans'schen Inseln gewährleistet eine Ausschaltung dieser Störfaktoren. Eine Schwierigkeit dieser Methode liegt in der geringen Größe der Inseln, sodaß zuerst nur Fischinseln Verwendung fanden (84). LACY isolierte 1962 Inseln aus lyophilisiertem Kaninchenpankreas, während

HELLERSTRÖM 1964 die Inseln unter dem Mikroskop aus frischem überlebendem exokrinen Gewebe herausschnitt (85). Eine andere Methode, die zu größerer Inselausbeute führt, ist die von MOSKALEWSKY 1965 beschriebene selektive Zerstörung des exokrinen Pankreasgewebes durch das Enzym Kollagenase (87). Diese Technik lag den Experimenten dieser Arbeit zu Grunde.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, um die Insulinsekretion an der isolierten Langerhans'schen Insel zu studieren: Bei der Inkubationsmethode liegen die isolierten Inseln in einer Kammer mit physiologischem Medium. Das sezernierte Insulin wird in regelmäßigen Zeitabständen in einer Probe des Inkubats bestimmt (16,44,59,65,70,87). Bei dieser Technik handelt es sich somit um Untersuchungen eines statischen Systems, wobei Aussagen über die Sekretionskinetik des Insulins nicht möglich sind. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß das sezernierte Insulin im Rahmen eines "feedback"-Mechanismus die weitere Hormonfreisetzung beeinflußt oder sogar hemmt (60,88). Ein weiterer Nachteil ist die Unmöglichkeit, Sequenzstimulierungen mit raschem Wechsel des Inkubationsmediums (89) durchzuführen. All diese Mängel entfallen bei der Perifusionsmethode, die von BURR et al. (90) erstmals zur Umströmung von Pankreasfragmenten verwendet wurde. Später wurde die Technik für die Umspülung isolierter Inseln modifiziert, wobei die Inselgewinnung "frei Hand" (85) oder durch Kollagenaseverdauung erfolgen konnte (91,92). Diese Perifusionsmethode isolierter Inseln bietet einerseits die Vorteile, die sich aus den Studien an der isolierten Insel ergeben: möglichst vollständige Ausschaltung der Proteasenwirkung des exokrinen Pankreas sowie der übrigen Beeinflussung durch Hormone oder Neurotransmitter. Andererseits können kinetische Sekretionsstudien und Sequenzstimulierungen durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit erfaßten Insulinsekretionsstudien wurden ausschließlich nach der Perifusionsmethode an enzymatisch isolierten Langerhans'schen Inseln vorgenommen.

1.3 Zweck dieser Arbeit

Es sollte eine Perifusionsmethode aufgebaut werden, um die bereits ausführlich diskutierten Probleme beim stimulus-secretion-coupling weiter zu untersuchen. Neben einer Reihe offensichtlicher Vorteile einer solchen Methode hat die Perifusion von Langerhans'schen Inseln eine Reihe von Nachteilen. Neben einer möglicherweise erheblichen Alteration der Zellmembranen durch die Kollagenase-Isolierung der Inseln ist die langfristige Hypoxie der Inseln während der Isolations- und Präperifusionsphase problematisch. Daraus könnte eine Hemmung von energieabhängigen Schritten im Sekretionsablauf und damit eine verschlechterte Insulinantwort auf einen Stimulus resultieren. Auch eine komplexere Schädigung der beta-Zellen wäre denkbar. Es sollte deshalb untersucht werden, ob durch Zugabe geeigneter Substanzen zum Präparationsmedium wie Glukose oder Pyruvat, die den Energiestoffwechsel der Inseln verbessern, oder durch Erhöhung von cAMP durch Theophyllin die Ansprechbarkeit der Inseln auf Stimuli und damit möglicherweise die Integrität des Gewebes verbessert werden kann.

2. METHODIK

2.1. Material

Serumalbumin vom Rind mit einem elektrophoretischen Reinheitsgrad von 100% stammte von den Behringwerken AG, Marburg/Lahn. Trasylol, ein Polypeptid aus Rinderlunge mit polyvalenter Proteinasenhemmwirkung wurde von Bayer, Leverkusen, bezogen. Die anfänglich verwendete Kollagenase Typ 4 (Nr.4186) kam von Worthington Biochemical Co, Freehold, New Jersey. Die schließlich verwendete Kollagenase (Kat.Nr. 17449) stammte von Serva Feinbiochemica, Heidelberg. Die mittlere Aktivität lag bei 100 PZ-E/g entsprechend ca 250 Mandl-E/mg. Pyruvat wurde von der Firma Böhringer, Mannheim, geliefert. Alle weiteren verwendeten Substanzen waren pro analysi der Fa. Merck, Darmstadt.

2.2. Isolation der Langerhans'schen Inseln

Die Isolation von Langerhans'schen Inseln aus dem Rattenpankreas erfolgte nach einer modifizierten Methode von LACY und KOSTIANOVSKY (91). Ziel der Operation war es, die intakten isolierten Inseln ohne exokrine Gewebsanteile in dem später beschriebenen Versuchsaufbau mit verschiedenen Lösungen zu umspülen (=perifundieren).

2.2.1. Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200 - 250 g. Vergleichende Experimente mit schweren (380 g) und leichten (150 g) Tieren zeigten keinen Unterschied in der Insulinantwort (Abb.1). Das Gewicht der Tiere scheint somit keine entscheidende Rolle im Experiment zu spielen, wohl aber waren mittelschwere Ratten leichter zu operieren. Die Tiere wurden mit Altromin^{R} gefüttert und mußten präoperativ 11 - 16 Stunden fasten.

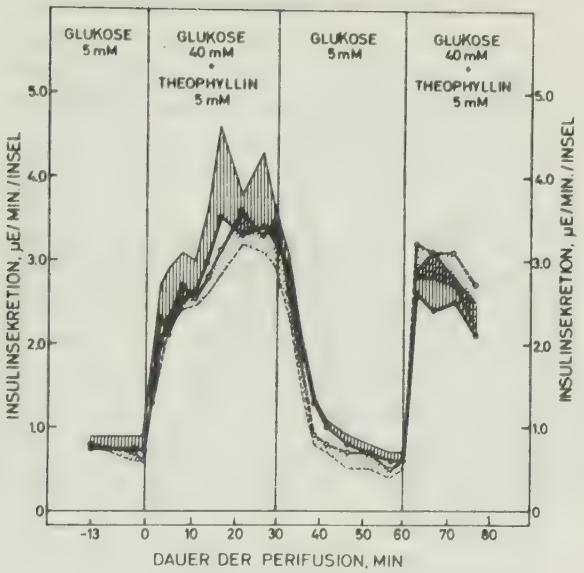

Abb. 1: Perifusion isolierter Pankreasinseln; Vergleich der Insulinsekretion von Langerhans'schen Inseln junger und alter Ratten (n=2); alte Tiere (380 g) ———, junge Tiere (150 g) - - - - -.

2.2.2. Anästhesie und Vorbehandlung

Die Anästhesie erfolgte mit 45 - 50 mg/kg Pentobarbital (Nembutal^{R}) intraperitoneal. Um eine möglichst große Inselausbeute zu erzielen, wurden die Tiere anfänglich zwei Stunden vor der Operation mit 0,3 ml einer 4 %igen Pilocarpinlösung (i.p.) vorbehandelt (65). Durch seine parasympathikomimetische Wirkung stimuliert Pilocarpin maximal die Saft- und Enzymsekretion des exokrinen Pankreas. Diese dadurch eliminierten Zymogene würden

sonst möglicherweise durch die folgende Kollagenaseverdauung freigesetzt und aktiviert und besonders die proteolytischen Bestandteile könnten dabei die Membranstrukturen der Inseln zerstören. Dementsprechend ergibt sich bei Pilocarpinvorbehandlung eine wesentlich größere Inselausbeute. Diese Behandlung hat jedoch zwei Nachteile: Erstens verwendete KUO (65) die Pilocarpininjektionen zur Inselisolierung nur bei Inkubationsstudien zur Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität, nicht aber bei Insulinsekretionsstudien, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Pilocarpin die Insulinsekretion beeinflußt (65) und dadurch die beta-Zellen zumindest partiell degranuliert. Zum zweiten wurde Pilocarpin, besonders im Zusammenhang mit Nembutal^{R}, von den Ratten sehr schlecht vertragen. Die Tiere antworteten extrem vagoton und starben gelegentlich an cerebralen Krämpfen oder Herzstillstand. Da auch eine niedrigere Pilocarpinkonzentration (1 %) die gleiche Wirkung zeigte, war diese Vorbehandlung für unsere Experimente ungeeignet.

2.2.3. Operation

Nach der Anästhesie mit Nembutal^{R} wurde der Bauchraum durch einen Mittelschnitt und zwei Querschnitte breit eröffnet. Die Leber wurde nach oben geschoben und der dann sichtbare Ductus choledochus knapp unterhalb der Vereinigung der Dd. hepatici abgebunden. Nach Aufsuchen der Mündung des Gallenganges in den Darm wurden etwa 7 ml der unten beschriebenen Pufferlösung durch eine Kanüle mit Kaliber 20 eingespritzt, wobei das vorherige Abbinden des Ductus choledochus einen Reflux in die intrahepatischen Gallenwege verhinderte. Dieser Teil der Operation erfolgte unter dem Mikroskop bei siebenfacher Vergrößerung. Das Abbinden des Darmes beidseits der Papille, um auch dort einen Reflux zu vermeiden, erwies sich als unnötiger Zeitaufwand. Zur Injektion wurde derselbe Puffer verwendet wie zur Perifusion, nämlich Krebs-Henseleit-Puffer (s. 2.4.), während in der Literatur (91) Hanks-Lösung benutzt wird. Vergleichende Experimente von uns erbrachten keinen Unterschied (Abb.2). Die Zusammensetzung der beiden Pufferlösungen ist in Tabelle 1 gegenübergestellt.

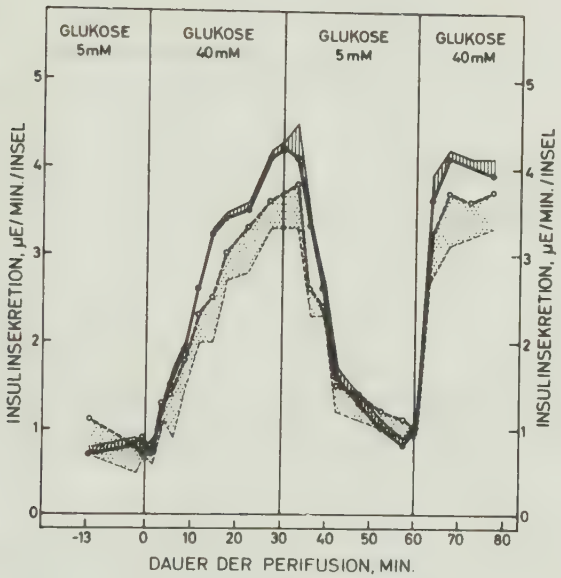

Abb. 2: Perifusion isolierter Pankreasinseln mit verschiedenen Pufferlösungen (n=2);
Krebs-Henseleit-Puffer ————————,
Hanks-Puffer --------.

Tab. 1: Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen.

	Krebs-Henseleit-Puffer mM	Hanks-Puffer mM
NaCl	120.0	140.0
KCl	4.7	5.4
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	2.5	1.3
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1.2	0.8
$NaHPO_4$	-	0.3
KH_2PO_4	1.5	0.4
$NaHCO_3$	20.0	n.B. bis pH 7.4
dazu jeweils 1 g% Albumin, 1000 KIE/ml Trasylol, Testsubstanzen.		

Da bei der Ratte die zwei großen Pankreasausführungsgänge direkt in den Gallengang münden (91), bläht sich das Organ bei richtiger Lage der Nadel weit auf, wobei es vor allem zur Desintegration des exokrinen Parenchyms kommt. Um eine Schädigung der Inseln, z.B. durch Hypoxie, zu vermeiden, erfolgten die weiteren Schritte zur Inselisolierung möglichst rasch und mit Ausnahme der Kollagenaseverdauung bei 0° bis $+ 4^{\circ}$ C. Das Pankreas wurde exzidiert, ohne große Gefäße oder den Darm zu verletzen, und in eine eisgekühlte Petrischale mit Krebs-Henseleit-Puffer gelegt.

2.2.4. Weiterverarbeitung und Kollagenaseverdauung

Das Pankreas wurde unter dem Mikroskop bei siebenfacher Vergrößerung von Fett und Blutkoageln befreit und mit der Schere möglichst klein geschnitten.

Zur Kollagenaseverdauung wurde anfänglich die von LACY et al.(91

beschriebene Methode benutzt: 6 mg Kollagenase pro ml Pankreasgewebe und kräftiges Schütteln des Gemisches mit der Hand im Wasserbad für 8 - 10 Minuten. Schüttelkraft und -frequenz waren individuell verschieden und die Inselausbeute bzw. die Güte der Isolierung variierte erheblich. Entweder waren die Inseln schon stark angedaut oder aber sie waren noch nicht vollständig vom umgebenden exokrinen Pankreas getrennt. Ein automatischer Schüttler konnte nicht verwendet werden, da seine Kippbewegung nicht ausreichte, um die geringe Gewebsmenge richtig durchzuschütteln. Neben der Bedeutung der mechanischen Behandlung des Gewebes war die Auswahl der Kollagenase extrem wichtig. Mit der anfangs von WORTHINGTON gelieferten, speziell zur Inselisolierung empfohlenen Kollagenase (Nr.4186) (93) war es nicht möglich, eine einwandfreie Trennung von Inseln und exokrinem Gewebe zu erreichen, da nach der angegebenen Schüttelzeit (91) noch grobe Gewebsstücke, wenig später nur vollständig verdautes Pankreasgewebe vorhanden war. Der Zeitpunkt, zu dem - wie erwartet - intakte Inseln in sonst verdauter Umgebung liegen sollten, ließ sich trotz wiederholter Experimente nicht feststellen. Kinetische Vergleichsstudien von zwei Chargen mit Probenentnahmen nach 6, 9 und 12 Minuten zeigten zwar Unterschiede im Verdauungsgrad des Pankreas, eine zufriedenstellende Inselisolierung konnte jedoch nicht erreicht werden. Es zeigte sich, daß bei längerer Lagerung der Kollagenase die Enzymaktivität stark abnahm und daß verschiedene Enzymchargen der gleichen Firma unterschiedlich wirkten. Somit war es nötig, jede Lieferung zu testen und sowohl Menge als auch Schüttelzeit neu zu ermitteln. Erst die Kollagenase der Firma Serva, lyophil reinst (s.2.1.), erbrachte regelmäßig eine gute Gewebsverdauung, sodaß eine Standardmethode entwickelt werden konnte: Pro Bauchspeicheldrüse wurden 10 mg Kollagenase in 1 - 2 ml Puffer gelöst und mit dem kleingeschnittenen Pankreas in ein Plastikgefäß gefüllt. Um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen, wurde ein Magnetrührer verwendet, auf dem ein temperaturgeregeltes Wasserbad befestigt war. Das Gemisch wurde bei 37° C, dem Wirkungsoptimum der Kollagenase, 5 Minuten mit 700 U/min und 10 Minuten mit 250 U/min geschüttelt. Danach wurde die

Lösung wieder in das Plastikröhrchen gefüllt, in dem vorher die Kollagenase gelöst worden war, mit Puffer aufgefüllt und kräftig durch eine Plastikspritze (20 ml) gezogen. Nach fünf Minuten wurde der Überstand abgesaugt und erneut Puffer eingespritzt. Dieser Vorgang wiederholte sich nach 4, 7 und 9 Minuten. Nach dem Abziehen des letzten Überstandes wurde das restliche Gewebsgemisch eisgekühlt und tropfenweise in eine ebenfalls eisgekühlte Petrischale gegeben und bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Gegen einen schwarzen Hintergrund zeigen sich die Inseln als kleine weiße, rundlich-ovale, kompakte Gebilde mit einem Durchmesser von etwa 50 µ. Mit einer Mikropipette wurden die Inseln zuerst in ein anderes Schälchen gebracht, um sie möglichst von restlichen exokrinen Gewebsteilen zu trennen. Anschließend wurden sie auf die mit Puffer angefeuchteten Filter gelegt.

Die Filtergehäuse wurden zugeschraubt, mit Kontrollpuffer aufgefüllt und in das Perifusionssystem eingebaut. Die Inselanzahl betrug etwa 150 pro Pankreas. Jede Perifusionskammer wurde mit 10 - 20 Inseln beladen. Durch die gleichzeitige Operation von zwei Ratten erhöhte sich die gewonnene Inselzahl, die nötige Menge konnte schneller gesammelt und auf die Filter gebracht werden. Damit verkürzte sich die Zeit von der Operation bis zum Beginn der Perifusion auf etwa 90 Minuten.

2.3. Versuchsaufbau und Durchführung der Perifusion

2.3.1. Versuchsaufbau

Der für die Perifusion verwendete Versuchsaufbau besteht aus einem Vorratsgefäß für die Pufferlösung(Perifusionslösung), einem Oxygenator, einem Umschaltventil, einem Thermostaten mit Wasserbad und Glasspirale sowie einer Perifusionskammer, einer Pumpe und einem Sammelgefäß. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt die Abbildung 3. Das Vorratsgefäß enthält die jeweils benötigte Perifusionslösung, die

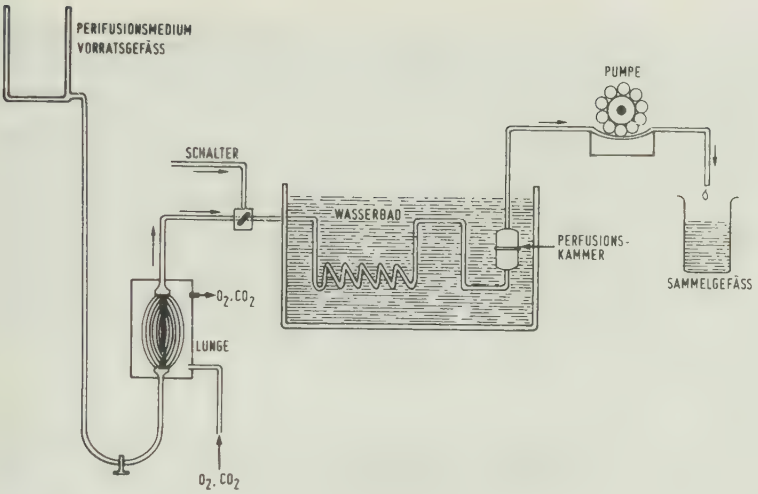

Abb. 3: Schematische Darstellung und Abbildung des Versuchsaufbaus (Erläuterungen siehe Text).

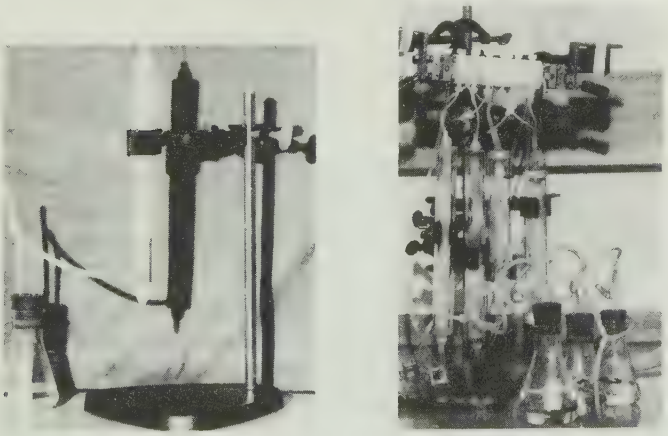

Abb. 4: Siliconlunge zur Oxygenierung der Perifusionslösungen (aus dem Entwicklungslabor Dr.Marx, Firma Fresenius, München).

mittels PVC-Schlauch dem Oxygenator zugeführt wird. Der Schalter, ein Schiebeventil mit Teflonauskleidung, ermöglicht einen raschen und problemlosen Wechsel von einer Perifusionslösung zur folgenden. Die Glasspirale und die Perifusionskammer befinden sich im Wasserbad, das durch eine thermostatisch regulierte Umwälzpumpe konstant auf 37° C gehalten wird. Daran schließt sich die Schlauchpumpe der Firma Ismatec an, die die Perifusionslösung mit konstanter Geschwindigkeit durch das System befördert. Nach der Pumpe wird das Perifusat in einem Sammelgefäß aufgefangen. Zu bestimmten Zeiten werden Proben zur Bestimmung von Insulin abgenommen.

2.3.2. Experimentelles Vorgehen bei der Perifusion

Um eine Optimierung der Versuchsergebnisse zu erreichen, war es notwendig, durch verschiedene Vorversuche mehrere Teile des Versuchsaufbaus zu testen und zu verbessern.

2.3.2.1. Oxygenierung der Perifusionslösung und Konstanthaltung des pH

Der Oxygenator hat die Aufgabe, den zur Perifusion verwendeten Puffer (Perifusionslösung) mit Sauerstoff und Kohlendioxyd zu sättigen und den pH-Wert möglichst konstant für die gesamte Dauer des Versuchs im physiologischen Bereich zu halten. Ursprünglich wurden sogenannte Glaslungen verwendet, an deren Innenwand der Puffer als dünner Flüssigkeitsfilm herunterfließt und mit seiner so vergrößerten Oberfläche mit dem zugeführten O_2 : CO_2-Gemisch im Gegenstrom in Kontakt war. Wegen technischer Schwierigkeiten und unbefriedigender Meßwerte sind wir zu sogenannten Siliconlungen übergegangen. Diese bestehen aus ca. 100 Siliconschläuchen mit einem Durchmesser von je 0,2 mm, durch die die Perifusionslösung auf Grund hydrostatischer Kräfte von unten nach oben fließt. Das Schlauchbündel ist in einem Plexiglaszylinder eingeschlossen, in dem eine Zuleitung und eine Ableitung für das zur Oxyge-

nierung notwendige O_2 : CO_2-Gemisch (95 : 5) angebracht sind (Spezialanfertigung des Entwicklungslabors Dr. Marx, Firma Fresenius, München). Das poröse Silicon ermöglicht einen optimalen Gasaustausch zwischen Puffermedium und dem die Schläuche allseits umgebenden Gasgemisch, ohne daß der Puffer aus den Schläuchen austreten kann (Abb.4). Auf diese Weise gelang es uns, die Werte für die O_2- und CO_2-Partialdrucke und den pH-Wert zu optimieren (Tab.2). Die gefundenen Partialdrücke für O_2 und CO_2 stimmen mit den Daten von IDAHL (94) und LACY (95) überein.

Tab. 2: O_2 - CO_2 - Partialdrücke und pH der Perifusionslösungen nach der Oxygenierung in der Siliconlunge (in Klammern Vergleichswerte Glaslunge).

	p_{O_2}	p_{CO_2}	pH
Nach der Lunge	419 (240)	37,2 (26)	7,34 (7,5)
Vor dem Filter	386 (131)	35,4 (24)	7,35 (7,6)

2.3.2.2. Umschaltventil

Die von uns durchgeführten Sekretionsstudien verlangen während des Versuchs einen mehrmaligen Wechsel der die Pankreasinseln umfließenden Pufferlösungen. Dazu dient die Schaltervorrichtung, die in der Versuchsanordnung zwischen Oxygenator und Wasserbad eingebaut ist. Die von uns anfangs eingesetzten Dreiwegehähne hatten den Nachteil, daß durch das notwendige Schlauchsystem der Totraum des Systems sehr groß wurde. zudem entstanden durch Betätigung des Dreiwegehahnes kleine Druckschwankungen und Turbulenzen, die wiederum erhebliche Auswirkungen auf die Sekretionsrate der nachgeschalteten Pankreasinseln hatte. IDAHL (94)

beschreibt z.B. eine signifikante Erhöhung der Insulinausschüttung durch Druckunterschiede, die nach einer Verzögerung der Schalterumstellung um nur eine Sekunde entstehen. Die von verschiedenen Autoren (16,96) gefundene, sofort eintretende, kurzzeitige Stimulation der Insulinsekretion nach Erhöhung der Glukosekonzentration in der Perifusionslösung dürfte zumindest teilweise seine Erklärung in den plötzlichen Druckdifferenzen bei der Umschaltung finden. Um solche störende Artefakte zu vermeiden, wurden statt der Dreiwegehähne Schiebeventile (Abb.5) mit Teflonausschichtung verwendet, die einen Totraum von ca, 5 µl aufweisen (Umschaltventile der Fa. Ismatec, wobei 6 Ventile mechanisch gekoppelt wurden). Der Wechsel von einem Medium auf das andere konnte hiermit innerhalb von Sekundenbruchteilen erfolgen, Auswirkungen auf die Insulinsekretionsrate wurden mit diesem Schalter nicht beobachtet. Mit den Schiebeventilen

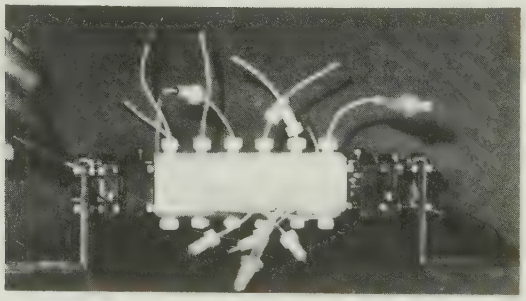

Abb. 5: Schiebeventile zur Umschaltung auf die verschiedenen Perifusionslösungen.

gelang es ferner, den Totraum des gesamten Systems nach der Schaltervorrichtung stark zu reduzieren. Wie ein Versuch mit einer J^{125}-Insulin markierten Perifusionslösung zeigt (Abb.6),

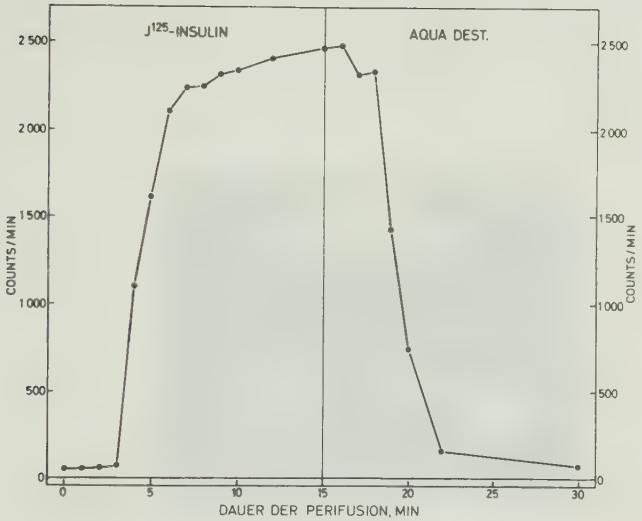

Abb. 6: Perifusion mit einer J^{125}-Insulin markierten Lösung zur Totraumbestimmung (n=4).

ist bereits 2 - 3 minuten nach der Betätigung des Schiebeventils im Sammelgefäß ein Anstieg der Radioaktivität zu verzeichnen, was einem Totraum von ca. 1 ml zwischen Ventil und Insel entspricht. Ein Plateau konstanter Maximalwerte ist nach ungefähr 5 - 6 Minuten erreicht. Diese Werte stimmen in etwa mit den Bedingungen bei anderen Autoren überein (42).

2.3.2.3. Perifusion der Pankreasinseln

Die Perifusionslösung wird durch die Glasspirale im Wasserbad auf 37° C erwärmt und anschließend der Perifusionskammer zugeführt. Bei dieser handelt es sich um ein Plastik-Filtergehäuse der Firma Millipore (Kat.Nr. SX 0001300) mit einem Volumen von ca. 5 ml (Abb.7). In der Mitte der Kammer befindet

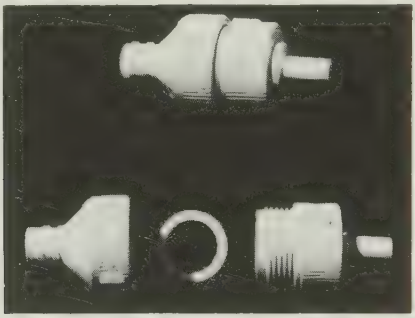

Abb. 7: Plastik-Filterhalter der Firma Millipore, verwendet als Perifusionskammer.

sich eine Fassung (Plastikfritte) für den Plastikfilter mit einer Porenweite von 1,2 µm. Diese dient zur Fixierung des Filterpapiers, auf das die Pankreasinseln aufgelegt werden. Die Auswahl des geeigneten Filterpapiers bereitete Schwierigkeiten, da sowohl eine Verminderung des Durchflusses durch zu kleine Poren zu vermeiden war, als auch bei zu großer Porenweite ein Durchrutschen der Pankreasinseln befürchtet werden mußte. Ein weiteres Problem stellte die mögliche Insulinbindung durch den Filter dar, was eine erhebliche Verfälschung der Sekretionsraten zur Folge gehabt hätte. Durch Versuche mit J^{125}-markiertem Insulin und anschließender Aktivitätsmessung des Filterpapiers konnte eine Insulinbindung überprüft und ausgeschlossen werden. Eine deutliche pH-Verschiebung

unter dem Einfluß verschiedener Filter (IDAHL, persönliche mitteilung) wurde durch entsprechende Messungen ebenfalls ausgeschlossen. Nachdem verschiedene Filterpapiere hinsichtlich dieser zu erfüllenden Kriterien erprobt worden waren, wurden Duralonfilter (Firma Millipore, Kat.Nr. NCWPO 1300) mit einer Porenweite von 14 µ verwendet.

Nach dem Aufbringen der Inseln (2.2.4.) werden die Perifusionskammern verschlossen und mit Pufferlösung aufgefüllt und anschließend in das System eingefügt.

Von großer Bedeutung für den gesamten experimentellen Ablauf ist die Perifusionsgeschwindigkeit, die durch die Schlauchpumpe am Ende des Systems reguliert wird. Die Position der Pumpe im Experiment hatte sich als die günstigste bezüglich gleichbleibender Strömungsverhältnisse herausgestellt. Zur Untersuchung verschiedener Stimuli auf die Insulinsekretionsrate ist der konstante Flow eine wichtige Voraussetzung, da, wie bereits erwähnt (s.2.3.2.2.), schon geringe Druckschwankungen erhebliche Auswirkungen auf die Sekretionsrate der beta-Zellen haben können. Ferner wurde von MITSURU HOSHI (92) gezeigt, daß verschiedene Perifusionsgeschwindigkeiten eine signifikant unterschiedliche Sekretionsrate des Insulins bei sonst gleichbleibenden Verhältnissen bedingen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Ergebnissen bei der Perfusion, wo verschiedene Durchflußgeschwindigkeiten zu keinen Änderungen der Insulinfreisetzung führen (87). Abhängig von der Zahl der perifundierten Inseln und der Größe der Perifusionskammern werden in der Literatur Perifusionsgeschwindigkeiten zwischen 150 µl/min (94) und 1 ml/min (607) angegeben. Nach mehreren Vorversuchen wurde für diese Arbeit eine Perifusionsgeschwindigkeit von 0,4 - 0,5 ml/min gewählt.

2.3.2.4. Experimentelle Durchführung der Perifusion

Das gesamte System wurde vor Beginn des Experiments mit Perifusionslösung gefüllt (s. 2.4.). Nach Einbau der mit Inseln bestückten Perifusionskammern erfolgte grundsätzlich eine

50minütige Kontrollperifusion mit 5 mM Glukose-Pufferlösung, um eine Adaptation der Pankreasinseln an die Versuchsbedingungen zu erreichen. Die anfangs massiv gesteigerte Insulinausschüttung, erklärbar durch die Traumatisierung der Inseln während der Isolation, fiel rasch ab und erreichte nach 30 - 40 Minuten eine allerdings von Filter zu Filter unterschiedliche Basalsekretionsrate. Zur Feststellung des Sekretionsniveaus wurden während dieser Auswaschphase drei Proben entnommen. In der 50. Minute erfolgte die Umschaltung auf die den zu testenden Stimulus enthaltende Lösung. Zunächst wurde in 2-minütigem, dann in 3-, später in 5-minütigem Abstand jeweils für 45 Sekunden Perifusat gesammelt. Nach der Rückschaltung auf die Kontrollösung in der 80. Minute wurden wieder nach 3, 5, später 10 Minuten Proben entnommen, um eine Änderung im Insulinsekretionsmuster zu zeigen. Bei den meisten Experimenten schloß sich eine zweite Stimulationsphase an, da aus der weiteren Sekretionsrate ein eventueller Priming-Effekt deutlich werden konnte. Insgesamt dauerte ein Experiment 130 Minuten und bei vier Perifusionskammern wurden dabei etwa 100 Proben gewonnen.

2.4. Zusammensetzung der Perifusionslösungen

Die Perifusionslösungen bestehen aus einem artefiziellen Medium mit 1 g% Rinderalbumin und Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer in folgender Zusammensetzung (in mM):

Tab. 3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers.

NaCL	120.0
KCl	4.7
$CaCl_2$	2.5
$MgSO_4$	1.2
$NaHCO_3$	20.0
KH_2PO_4	1.5

Das Rinderalbumin dient zur Verhinderung von Wandabsorption des Insulins an Glas und Kunststoff und zur Stabilisierung von Insulin im Perifusat.

Ein Teil des Puffers, ohne $NaHCO_3$ und KH_2PO_4, wurde vor Verwendung ca. eine Stunde lang mit einem O_2-CO_2-Gemisch (95 : 5) begast.

Ferner enthält der Puffer Trasylol in einer Konzentration von 1000 KIE/ml zur Inhibierung eventuell freigesetzter Proteasen aus exokrinen Gewebsanteilen.

Diesem Perifusionsmedium wurden einzeln oder in Kombination Glukose, Theophyllin oder Pyruvat in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Das Kontrollmedium enthielt 5 mM Glukose. Die Lösungen wurden vor dem Beginn des Experiments mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 7,4 eingestellt und durch Begasung mit einem O_2-CO_2-Gemisch (95 : 5) während des Versuchs konstant gehalten (s. 2.3.2.1.).

2.5. Insulin-Radioimmunoassay

Die Insulinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip der von HALES und RANDLE beschriebenen Doppelantikörpermethode (97). Der Insulin-Kit stammte von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig. Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Insulin wurde eine semiautomatische Filtrationsmethode benutzt (98). Die Radioaktivität des gebundenen Tracers wurde mit einem Gamma-Guard, Fa. Tracerlab, Köln, gemessen, wobei die Zählausbeute für J^{125} 75 % betrug. Zur Errechnung der Insulinkonzentration dienten Eichkurven mit Humaninsulin als Standard, da der Vergleich mit hochgereinigtem Rateninsulin nur quantitative Unterschiede im Sekretionsprofil zeigte (87). Die Berechnung der Humaninsulinäquivalente erfolgte mit Hilfe der Spline-Approximation unter Verwendung des Siemens Computers Typ 404/3 (99).

In Abwandlung der dem Kit von Amersham Buchler beiliegenden Vorschriften zur Insulinbestimmung, die nur für die Bestimmung

von Seruminsulin gelten, setzten wir unsere Standards in der jeweils verwendeten Perifusionslösung an. Alle in den Lösungen verwendeten Substanzen hatten keinen Einfluß auf den Radioimmunoassay.

2.6. Auswertung der Ergebnisse

Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse wurde berücksichtigt, daß die Basiswerte der Insulinsekretion bei den einzelnen Experimenten stark variierten: Die Basissekretion jeder einzelnen Perifusionkammer wurde deshalb als 100 % angenommen, und alle weiteren Sekretionswerte vom Beginn der ersten Stimulationsphase an wurden daran abgelesen. Als Einheit der Ordinate ergibt sich demnach die Inselsekretion pro 20 Inseln in Prozent der Basissekretion. Gleichzeitig wurde der Standard error berechnet. In der Zeitachse (Abszisse) wurde der Beginn des Experiments nach erfolgter 50-minütiger Präperifusion mit Minute 0 gekennzeichnet, wobei die Zeitverschiebung von drei Minuten auf Grund des gemessenen Totraums des Systems berücksichtigt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einleitende Bemerkungen

Obwohl die Methode der Perifusion viele Vorteile bietet, ist sie zweifellos auch - wie schon erwähnt - mit Schwierigkeiten verbunden. So ist es nicht auszuschließen, daß während der Kollagenaseverdauung Zymogene der exokrinen Pankreasanteile die Plasmamembran der Inseln angreifen. NORFLEET et al (100) postulierte den Verlust von Inhibitorrezeptoren, da Somatostatin nur im intakten Organ (Pankreasperfusion) die glukosestimulierte Insulinsekretion blockieren konnte, jedoch nicht in der Perifusion Kollagenase-isolierter Inseln.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Zeit von der Operation bis zur Durchströmung mit oxygenierter Pufferlösung. Die isolierten Langerhans'schen Inseln befinden sich relativ lange in einem an- bzw. hypoxischen und damit energetisch ungünstigen Zustand, was eine irreversible Schädigung der empfindlichen zellulären Mechanismen zur Folge haben könnte. Da die Isolationszeit nicht wesentlich verkürzt werden kann, bleibt zur Verbesserung der Ergebnisse der Versuch, die Inseln während der Isolationsphase durch Zusatz verschiedener Substanzen in einen energetisch günstigeren Zustand zu versetzen.

Glukose ist nicht nur der wichtigste und am besten untersuchte Stimulus der Insulinsekretion, sondern wirkt auch als Energielieferant (101). Deshalb wurde Glukose in einer ersten Versuchsreihe als Energiespender getestet(s.3.2.). Als Stimuli dienten verschieden hoch konzentrierte Glukoselösungen mit und ohne Zusatz von Theophyllin. Die sekretionssteigernde Wirkung dieser Substanz auf die Glukose-induzierte Insulinausschüttung ist bekannt (59,69,102). Ob sich die Zugabe von Theophyllin während der Isolationsphase günstig auf die beta-Zellen auswirkt, sollte in einer zweiten Versuchsreihe ermittelt werden (s. 3.3.). Da umstritten ist , ob Theophyllin allein (87) oder nur in Anwesenheit von Glukose die Insulinsekretion steigert (59,70,72), wurde Theophyllin zusätzlich mit Glukose während der Isolation zugesetzt (s. 3.4.). Darüberhinaus sollte ein

weiterer Energiespender untersucht werden, wobei sich in Anlehnung an Experimente von PACE (101) und MATSCHINSKY (103) Pyruvat anbot.

3.2. Vorbehandlung der Inseln mit verschiedenen Glukosekonzentrationen

Entsprechend einer von GRODSKY (104) publizierten Dosis-Wirkungskurve für Glukose (Abb.8) untersuchten wir für diese Fragestellung die Wirkung von 5, 10, und 40 mM Glukose im Insel-Isolationsmedium.

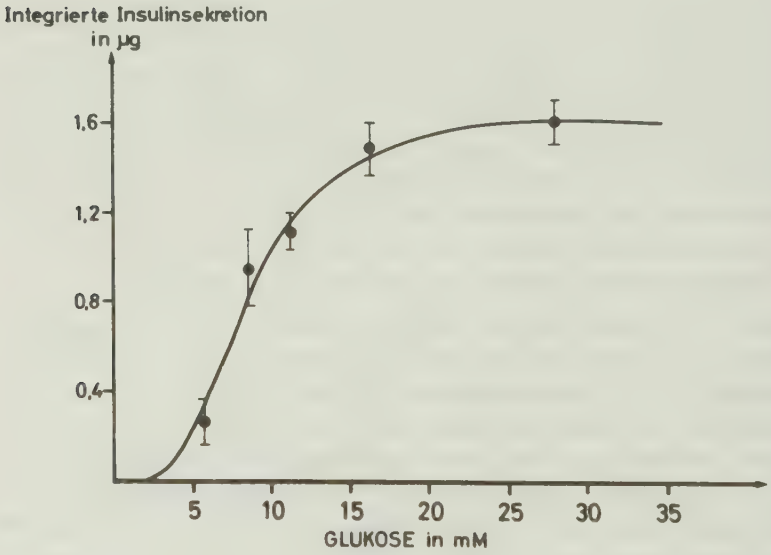

Abb. 8: Dosis-Wirkungskurve für Glukose (nach Grodsky).

3.2.1. Zugabe von 5 mM Glukose zum Präparationsmedium

In Abb. 9 sind bei gleicher Vorbehandlung in einem 5 mM Glukose enthaltenden Medium die Insulinsekretionsmuster bei Stimulation mit 40 mM Glukose und 20 mM plus 5 mM Theophyllin dargestellt.

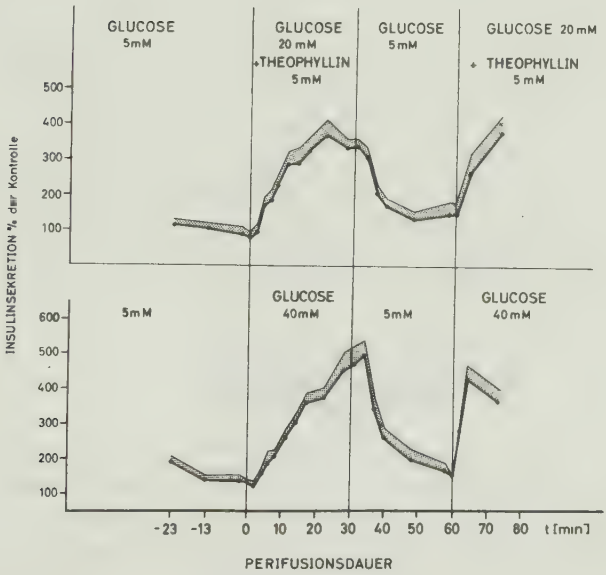

Abb. 9: Einfluß einer Präparation in 5 mM Glukose auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion mit bzw. ohne Theophyllinzusatz (n=4).

Die 40 mM Glukose-induzierte Insulinsekretion zeigt innerhalb der 30-minütigen Stimulationsphase einen gleichmäßigen Anstieg, der das fünffache der Basissekretion erreicht. Biphasizität wird nicht beobachtet. Nach Umschaltung auf ein 5 mM Glukose enthaltendes Perifusionsmedium erfolgt nach 5-minütiger Latenz ein prompter Abfall. Nach Restimulation mit 40 mM Glukose ist bereits nach 10 Minuten beinahe die Sekretionshöhe der ersten Stimulationshöhe erreicht. Diese Empfindlichkeitssteigerung der Glukose-induzierten Insulinsekretion, der sog. "priming"-Effekt, wurde in Perfusionsexperimenten bereits beschrieben (87,105). Die Stimulation mit 20 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin unterscheidet sich nur unwesentlich im Sekretionsmuster. Der Anstieg der Insulinausschüttung erfolgt etwas rascher, die Menge des sezernierten Insulins ist jedoch vergleichbar mit der durch 40 mM Glukose provozierten Freisetzung. Eine biphasische Insulinsekretion ist auch mit Theophyllin nicht zu beobachten. Der Abfall in der anschließenden Kontrollphase verläuft ähnlich wie nach 40 mM Glukose. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen ist in einer zweiten Stimulationsphase eine Sensibilitätssteigerung der beta-Zellen für Glukose zu beobachten.

3.2.2. Zugabe von 10 mM Glukose zum Präparationsmedium

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden zeigt sich nach einer Vorbehandlung der Inseln mit 10 mM Glukose nur eine Verdopplung der Insulinausschüttung, gleichgültig ob die Inseln mit 20 oder 40 mM Glukose oder mit 20 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin perifundiert wurden (Abb. 10). Raschheit und Höhe der Sekretion nehmen zwar während einer Restimulation zu, erreichen jedoch nicht die Werte, die mit substimulatorischen Glukosekonzentrationen (5 mM) im Präparationsmedium erzielt werden (vgl. Abb. 9 und 10).

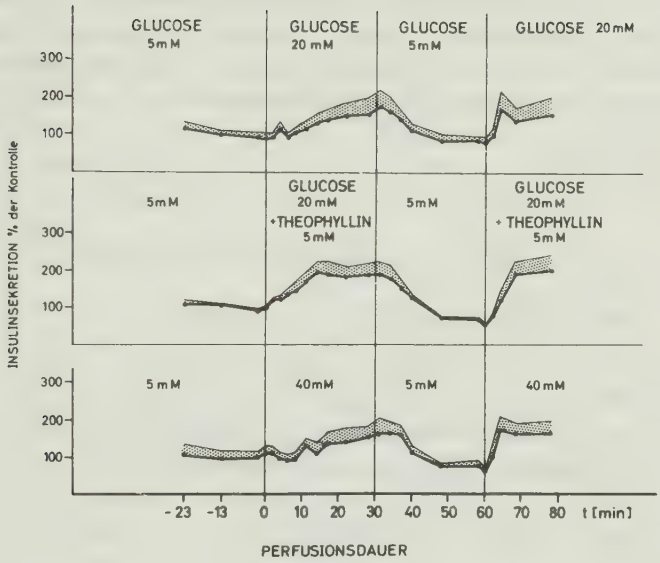

Abb. 10: Einfluß einer Präparation in 10 mM Glukose auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion mit bzw. ohne Zusatz von Theophyllin (n=6).

3.2.3. Zugabe von 40 mM Glukose zum Präparationsmedium

Bei diesen Experimenten wurde mit 20 mM und 40 mM Glukoselösung jeweils ohne Theophyllin perifundiert (Abb. 11). Unter beiden Bedingungen lassen sich nahezu identische Sekretionsmuster mit einem langsamen und gleichmäßigen Anstieg der Insulinfreisetzung auf das Dreifache der Basiswerte messen. Nach Stimulation mit 40 mM Glukose findet sich eine angedeutete Biphasizität. In der Restimulationsphase ist nur bei sehr hoher Glukosekonzentration eine beschleunigte Insulinsekretion nachweisbar.

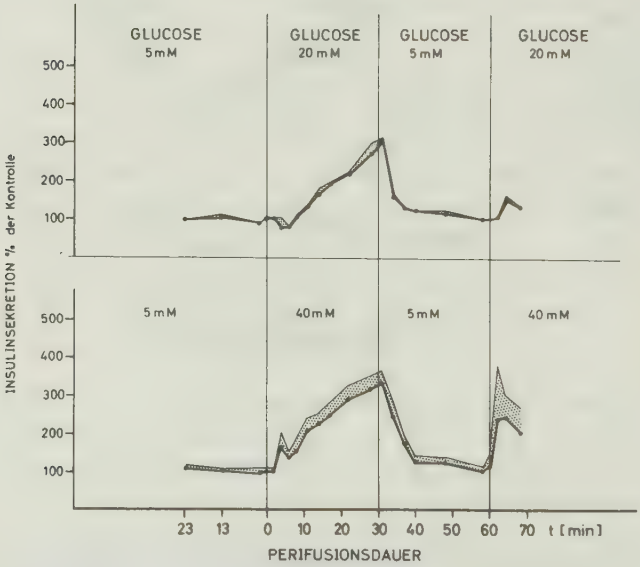

Abb. 11: Einfluß einer Präparation in 40 mM Glukose auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=4).

3.3. Vorbehandlung der Inseln mit 5 mM Theophyllin

Es konnte gezeigt werden , daß die Aktivierung des Adenylatzyklase-Systems durch Theophyllin oder Coffein bei unterempfindlichem Inselzellgewebe eine Sensibilitätssteigerung der beta-Zellen auf verschiedene Stimuli bewirkt (106) oder daß bei normal insulinsezernierenden Langerhans'schen Inseln die Vorbehandlung mit einem Methylxanthin die Ansprechbarkeit der beta-Zellen auf bestimmte Substanzen (i.e. Phenylalanin, Alanin, Leucin) gesteigert werden kann (89). Es sollte deshalb untersucht werden, ob durch Zugabe von Theophyllin zum Präparationsmedium während der Kollagenase-Isolierung der Inseln eine gesteigerte Glukoseempfindlichkeit der beta-Zellen erreicht werden kann.

3.3.1. Stimulation mit Glukoselösungen

Als Testkonzentrationen wurden 10 mM, 20 mM und 40 mM Glukose eingesetzt (Abb. 12). Während mit 10 mM und 20 mM Glukose keine wesentliche Änderung der Insulinsekretionskinetik zu erkennen ist, läßt sich durch 40 mM Glukose eine Stimulation der Insulinfreisetzung messen, die etwa dem Zweifachen der Basalsekretion entspricht. Ein priming-Effekt läßt sich auch erst bei dieser hohen Glukosekonzentration nachweisen.

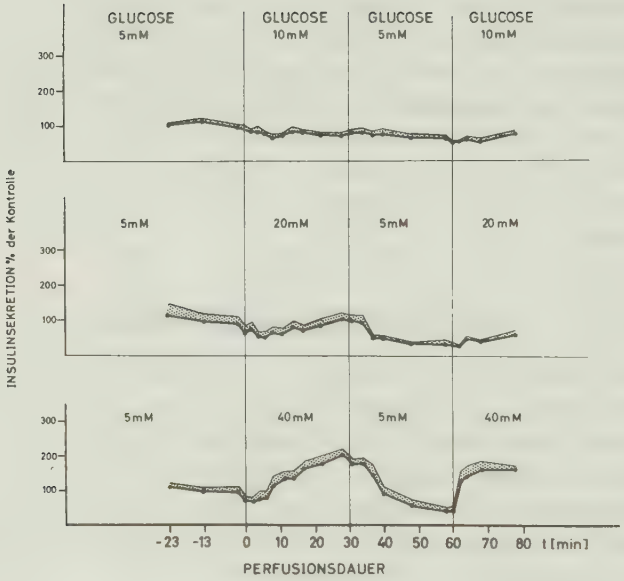

Abb. 12: Einfluß einer Präparation in 5 mM Theophyllin auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=6).

3.3.2. Stimulation mit Glukoselösungen plus 5 mM Theophyllin

Unter diesen Bedingungen zeigt sich bereits bei niedriger Glukose (10 mM) eine deutliche Zunahme der Insulinsekretion (Abb. 13). Der Anstieg in einer Restimulationsphase ist steiler und höher als in der ersten. Die Insulinsekretionsmuster bei Stimulation mit 20 mM bzw. 40 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin sind annähernd gleich. Die Vorbehandlung der Langerhans'schen Inseln mit Theophyllin führt demnach nicht zu einer Sensibilitätssteigerung der Inseln für Glukose.

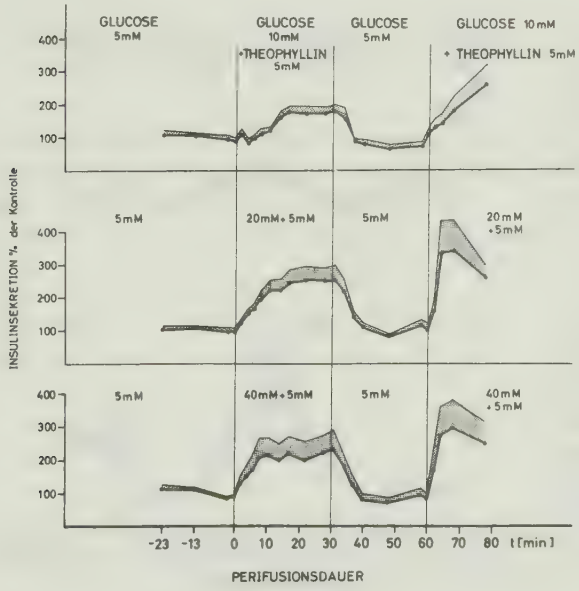

Abb. 13: Einfluß einer Präparation in 5 mM Theophyllin auf eine nachfolgende durch Glukose plus Theophyllin induzierte Insulinsekretion (n=6).

3.4. Vorbehandlung der Inseln mit 5 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin

Da mit Theophyllin allein in der Vorbehandlung kein Effekt erzielt werden konnte, sollte versucht werden, durch Substratangebot an die Langerhans'schen Inseln (5 mM Glukose) plus Aktivierung des Adenylatzyklase-Systems (5 mM Theophyllin) eine Optimierung der Glukoseansprechbarkeit der beta-Zellen zu erzielen.

Abb. 14 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente. Während bei Stimulation mit 10 mM Glukose keine sekretionssteigernde Wirkung zu erzielen war (nicht gezeigt), erkennt man bei 20 mM Glukose einen langsamen Anstieg der Insulinausschüttung auf

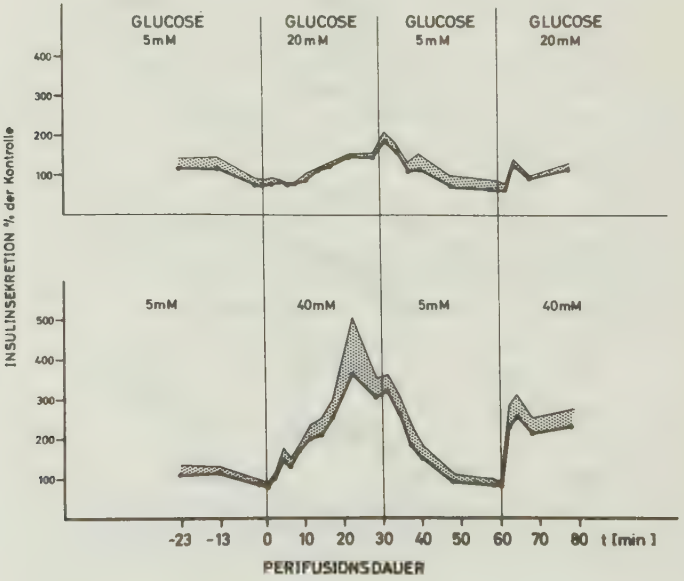

Abb. 14: Einfluß einer Präparation in 5 mM Glukose plus 5 mM Theophyllin auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion (n=4).

das ca. 2,5fache des Ausgangswertes. Die Stimulation mit 40 mM Glukose führt zu einem langsamen Anstieg der Insulinsekretionsraten auf das Vierfache der Basalsekretion. Obgleich eine Restimulation mit 40 mM Glukose zu einer sehr raschen Insulinantwort führt, wurden nicht die gleichen Sekretionsraten wie bei der ersten Stimulation erzielt.

3.5. Vorbehandlung der Inseln mit Pyruvat

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß Pyruvat ein energielieferndes Substrat für Langerhans'sche Inseln sein kann (101,103). Da einige Autoren durch Zugabe von Pyruvat zum Inkubations- oder Perfusionsmedium die Insulinsekretionsantwort der Inseln verstärken konnten, sollte die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung Kollagenase-isolierter Inseln nach Präparation der Inseln in 5 mM Pyruvat gemessen werden.

Wie in Abb. 15 gezeigt, führt 40 mM Glukose mit und ohne 5 mM Pyruvat während der Stimulationsphase zu keiner wesentlichen Insulinsekretion.

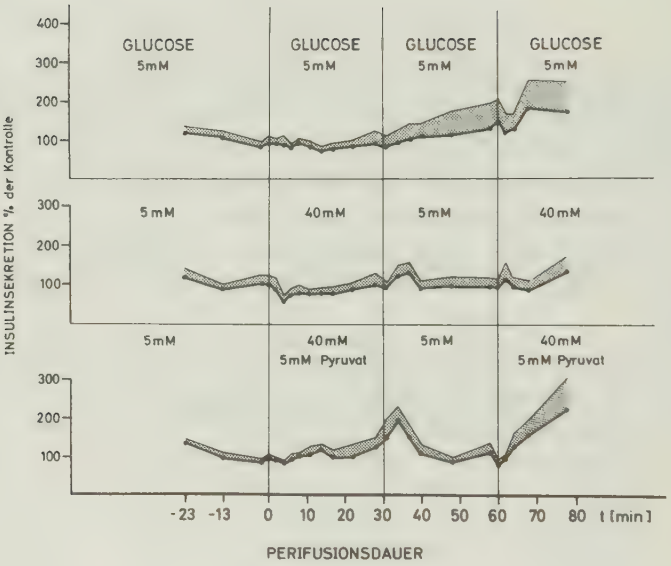

Abb. 15: Einfluß einer Präparation in 5 mM Pyruvat auf eine nachfolgende Glukose-induzierte Insulinsekretion mit und ohne Zugabe von Pyruvat (n=6).

4. DISKUSSION

4.1. Glukose-induzierte Insulinsekretion

Glukose, der beste und am häufigsten untersuchte Stimulator der Insulinsekretion ruft nach den meisten Autoren (18,50,63, 89,108) ein biphasisches Sekretionsmuster hervor: Einem ersten schnellen Sekretions-Peak folgt eine langsame kontinuierliche Erhöhung der Insulinsekretion. Ein Erklärungsversuch dieses Phänomens stammt von GRODSKY et al. (109): Die kurze initiale Sekretionsphase beruht demnach auf der Entleerung des labilen Kompartiments, das nur einen kleinen Teil des pankreatischen Insulins ausmacht. Die Freisetzung des verbleibenden größeren Teils, des stabilen Kompartiments, ist zusammen mit der Sekretion von neusynthetisiertem Insulin für die verzögerte, langsam ansteigende Sekundärphase verantwortlich. Dabei ist erwiesen, daß Glukose die Synthese von Insulin und Proinsulin stimuliert (110,111). Über die Natur der Kompartimente lassen sich nur Vermutungen äußern. Sowohl die unterschiedliche Sekretionsbereitschaft oder Empfindlichkeit der beta-Zellen (112) als auch Ionen- oder Metabolitveränderungen in der Zelle könnten dabei eine Rolle spielen. Eventuell wirkt sich auch ein negativer "feedback"-Mechanismus des bereits sezernierten Insulins aus (60,113).

Wie auch bei anderen Autoren (42,60,92,95,96) läßt sich in unseren Experimenten dieses biphasische Sekretionsmuster nicht feststellen. Eine mögliche Erklärung wäre - geht man auf das Kompartimentierungsmodell ein - eine vorzeitige Entleerung des kleinen labilen Insulinpools während der Präparation. Möglicherweise führt die Kollagenasebehandlung der Inseln zu einer teilweisen Schädigung der beta-Zellmembranen. Dies würde auch die hohen Insulinkonzentrationen im Perifusat erklären, die dann als "Auswascheffekt" am Anfang jeder Perifusion gedeutet werden könnten. Erst etwa 30 Minuten nach Beginn der Perifusion wird eine basale Insulinfreisetzung erreicht, die dann konstant bleibt und damit aktive Sekretion repräsentiert. Diese Basalsekretion ist jedoch von Inselpräparation zu Inselpräparation sehr schwankend.

Wir fanden nur unter einer bestimmten experimentellen Bedingung ein angedeutetes biphasisches Sekretionsmuster (Abb. 11 unten). Dies steht im Gegensatz zu Daten von HENQUIN (114), der mit einer vergleichbaren Inselpräparation reproduzierbare, biphasische Sekretionsmuster für Insulin fand. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen ist derzeit nicht möglich.

Ein interssanter Effekt ist das sog. "priming" (87,105), d.h. eine Empfindlichkeitssteigerung der Inseln während einer Restimulation. Eine Erklärungsmöglichkeit liefert GRODSKY (105) mit der Annahme, daß während der Kontrollperifusion, die zwischen die erste und zweite Stimulation eingeschaltet ist, ein nicht bekanntes Agens das labile Insulinkompartiment überfüllt, was bei nochmaliger Stimulation zu einer schnellen hohen Sekretion führt. Der priming-Effekt könnte aber auch durch eine zeitlich begrenzte Sensibilitätssteigerung des Glukorezeptors an der beta-Zellmembran bedingt sein. Daten, die diese hypothetische interessante Möglichkeit unterstützen könnten, sind nicht verfügbar.

Die Interpretation der Experimente, in denen die Abhängigkeit verschiedener Glukosekonzentrationen im Präparationsmedium auf die nachfolgende Glukose-induzierte Sekretionskinetik von Insulin untersucht wurde, ist schwierig.

Während in Anwesenheit von 5 mM Glukose in der Präparationsphase der Inseln eine gute Ansprechbarkeit der isolierten Inseln in der nachfolgenden Perifusion zu beobachten ist, findet sich bei der Vorbehandlung mit 10 mM Glukose eine überraschend niedrige Insulinstimulierbarkeit durch Glukose. Die Sekretionshöhen nach einer Präparation der Inseln in einer 40 mM Glukoselösung sind zwar größer, erreichen jedoch nicht die nach 5 mM Glukosevorbehandlung gemessenen Insulinspiegel. Darüberhinaus ist keine Steigerung der Insulinfreisetzung durch Erhöhung der Glukosekonzentration von 20 auf 40 mM im Perifusionsmedium zu erzielen, und man vermißt, wie bereits erwähnt, das sowohl in vivo als auch in vitro (Pankreasperfusion) zu beobachtende biphasische Sekretionsmuster.

Offensichtlich führt selbst die kurzfristige, niederdosierte Kollagenasebehandlung des Pankreas zu einer wesentlichen Änderung der Glukoseansprechbarkeit der Langerhans'schen Inseln. Die molekulare Basis dieser Unterempfindlichkeit der beta-Zellen ist keineswegs klar. Wie ANDERSON et al. (115) zeigen konnten, ist die Ultrastruktur kollagenase-behandelter Inseln sehr gut erhalten. Auch der Insulingehalt von beta-Zellen der auf diese Weise isolierten Langerhans'schen Inseln (116) sowie die Fähigkeit dieser Zellen , Insulin zu synthetisieren (117), scheinen durch die Kollagenase im wesentlichen unbeeinflußt. Es fehlen jedoch systematische Vergleichsuntersuchungen unter den gleichen experimentellen Bedingungen mit der Frage, ob nicht doch quantitative strukturelle oder biochemische Unterschiede zwischen Inseln, die zum Beispiel "frei Hand" dissezïiert wurden und solchen, die mit Kollagenase isoliert wurden, bestehen. CAPITO und HEDESKOV (81) fanden bei der Messung der Adenylatzyklaseaktivität, daß Kollagenase sehr wohl eine signifikante Erniedrigung der Enzymaktivität in Langerhans'schen Inseln verursachen kann. Da dieses Enzym vorwiegend plasmamembrangebunden ist, wäre es möglich, daß auch noch andere Membranfunktionen der beta-Zelle wie Ionenflux und Stimuluserkennung (Glukorezeptor?) durch Kollagenase verändert werden. Untersuchungen mit Pronase, ebenfalls einem Proteasegemisch, weisen in die Richtung einer selektiven Modifizierung der beta-Zellmembran mit vermehrter Glukose-induzierter Insulinsekretion bei niedriger Pronasekonzentration und verminderter Insulinantwort bei hoher Pronasekonzentration (118).

Erstaunlicherweise ergibt sich bei der Vorbehandlung der Inseln mit der hochkonzentrierten Glukoselösung (40 mM) ein wesentlich niedrigeres Sekretionsprofil als bei der Verwendung von 5 mM Glukose. FRANKEL et al. (119) konnten zeigen, daß während einer Präinkubation in hoher Glukosekonzentration eine schnelle Kalziumauffüllung der Inseln erfolgt. Weiterhin führt eine hohe Glukosekonzentration zu einer vermehrten Glykolyse, Glukoseoxidation und Insulinbiosynthese in den Inseln. Der gesteigerte Stoffwechsel sowie die intrazelluläre Kalziumakkumulation könnten eine massive Insulinausschüttung schon während der

Isolationsphase hervorrufen und so zu einer längerdauernden Insulinverarmung der Zellen führen. Auch eine durch das in hoher Konzentration im Medium vorhandene Insulin verursachte Inhibierung der Insulinsekretion wäre denkbar (113).

Allerdings muß betont werden, daß sich die letztgenannten Vorgänge wahrscheinlich nur während der 15-minütigen Kollagenaseverdauung abspielen können, die bei einer Temperatur von 37° C stattfindet. Da alle anderen Schritte der Isolierung bei 0 - 4°C ablaufen, dürfte der Stoffwechsel unter diesen Bedingungen stark gebremst sein und die Insulinsekretion sistieren (87).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt (120,121), daß die beta-Zellempfindlichkeit für bestimmte Modulatoren der Insulinsekretion (i.e.Somatostatin, Epinephrin) erst nach einer längeren, d.h. ca. 48 Stunden dauernden Regenerationsphase der Kollagenase behandelten Inseln in einem Kulturmedium wiedergefunden werden konnte. Die Langerhans'schen Inseln sind selbst nach einer längeren Aufbewahrung im Kulturmedium bis zu fünf Wochen unter geeigneten Bedingungen noch in der Lage, Insulin zu sezernieren (122). Dies spricht dafür, daß die Kollagenase wahrscheinlich nu zu einer vorübergehenden Änderung der Ansprechbarkeit der Insel führt, die durch Substratangebot (Glukose oder Pyruvat) zumindest in unseren Akutversuchen nicht verhindert werden konnte.

4.2. Einfluß von Theophyllin auf die Insulinsekretion

Theophyllin führt als Hemmer der Phosphodiesterase zu einem Anstieg der insulinären cAMP-Konzentration (59,110). Diese Konzentrationsänderung scheint für den Triggermechanismus der Insulinfreisetzung von wesentlicher Bedeutung (79). Neben der Beeinflussung des Adenylatzyklase-Systems in der beta-Zelle greift Theophyllin entscheidend in den Kalziumhaushalt der Langerhans'schen Inseln ein. Außer einer Steigerung des Kalzium-Efflux (102) scheint diese Substanz auch eine intrazelluläre Translokation von Kalzium aus einem membrangebundenen in einen zytosolischen Pool zu stimulieren. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt möglicherweise über eine

Aktivierung des mikrotubulären-mikrofilamentären Systems (44-49) zu einer Steigerung der Exozytose von Insulingranula (102) und damit zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung. Diese intrazelluläre Kalziumtranslokation scheint nach HENQUIN (114) für die zweite Phase der Insulinsekretion von großer Bedeutung, während für die erste Phase ein Kalzium-Influx wichtig ist, der unter anderem von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist.

Glukose induziert nicht nur eine Erhöhung des cAMP (59,61), sondern auch eine Senkung des Kalzium-Efflux (39). Es wird deshalb verständlich, warum Theophyllin die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung zu potenzieren vermag.

Neuere Untersuchungen beleuchten den Glukose-induzierten Kalziuminflux näher (123). Offensichtlich existieren zwei verschiedene Kalzium-Pools, wobei der erste sich schnell und unabhängig von der Glukosekonzentration füllt, während das zweite und größere Kompartiment auf Glukose anspricht (119,123). Der an der Oberfläche gelegene erste Pool ist ebenso schnell entleerbar und könnte während des komplizierten Isolationsverfahrens ausgewaschen werden (123). Interessant ist, daß bei Präinkubation der Inseln in hoher Glukosekonzentration eine schnellere Auffüllung mit Kalzium erfolgt (119). Auch HELLMAN und GYLFE (124) sprechen von verschiedenen Kalzium-Pools, wobei ein Teil des Kalziums mit Lanthanum austauschbar ist (125). Sie stellten fest, daß ein sehr labiler Pool existiert, der rasch aufgefüllt, aber wieder "ausgewaschen" werden kann. Die Änderungen in dem mit Lanthanum austauschbaren Kalzium-Pool scheinen einen regulatorischen Einfluß auf die Insulinfreisetzung zu haben, sind aber anscheinend kein Ergebnis der Sekretion (124).

Es ist noch unklar, ob bei der Kalziumumverteilung das cAMP als Vermittler dient oder ob es sich um einen unabhängigen Prozeß handelt (126). SEHLIN (127) stellte nämlich fest, daß Theophyllin selbst in der Mikrosomenfraktion die Kalziumaufnahme senkt, und FORMBY (128) zeigte, daß Coffein die Ca-ATPase-Aktivität im granulären und mikrosomalen Homogenat inhibiert.

Auch die Kalziumabhängigkeit der cAMP-Erhöhung ist umstritten. Während bei der Glukose-induzierten cAMP-Erhöhung anscheinend extrazelluläres Kalzium nötig ist (33,60), wirkt Theophyllin auf das cAMP unabhängig vom Kalziumgehalt im Medium (33). CAPITO und HEDESKOV (78) berichteten, daß im Inselhomogenat die stimulierende Wirkung von Glukose auf die Adenylatzyklase auch ohne extrazelluläres Kalzium stattfindet.

Auf Grund der Daten aus der Literatur lag die Frage nahe, ob Theophyllin die herabgesetzte Sekretionsantwort der beta-Zellen Kollagenase-isolierter Inseln wieder normalisieren kann. In kultiviertem fötalen Rattenpankreas waren Methylxanthine in der Lage, die beta-Zellsensitivität für eine Reihe von Stimuli signifikant zu steigern (106,129). LANDGRAF-LEURS et al. (107) konnten kürzlich zeigen, daß die Vorbehandlung adulter Rattenpankreata mit Theophyllin die beta-Zellen ebenfalls für bestimmte Stimuli empfindlicher machen kann.

Die Inkubation des Pankreasgewebes während der Kollagenase-Behandlung und der Isolierungsphase der Langerhans'schen Inseln mit 5 mM Theophyllin war jedoch nicht imstande, die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung in der nachfolgenden Perifusion zu verbessern. Die fehlende Glukose während der Präparation führt sicherlich zu einem gesteigerten Katabolismus mit Verminderung energiereicher Verbindungen in den Inseln. Es wäre daher denkbar, daß die stark herabgesetzte Insulinfreisetzung während der Glukose-Perifusion energetische Gründe hat. Dem widersprechen jedoch die Experimente, in denen Glukose und Theophyllin gemeinsam perifundiert wurden. Da Theophyllin keine energiereiche Substanz ist und nicht als Substrat der beta-Zelle zugänglich ist, dürfte Theophyllin unter diesen Bedingungen die Glukose-induzierte Insulinsekretion nicht stimulieren. Wir fanden jedoch sowohl eine Beschleunigung als auch eine Erhöhung der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung. Diese Befunde sprechen demnach mehr für eine Theophyllin-bedingte Änderung des Adenylatzyklase-Kalzium-Systems in den Inseln.

Es lag daher nahe, während der Präparationszeit dem Pankreasgewebe sowohl Theophyllin als auch Glukose in niedrigen Kon-

zentration (5 mM) zuzufügen und anschließend die Glukose-induzierte Sekretionskinetik für Insulin zu messen. Zwar kann hier die Glukoseempfindlichkeit der Inseln durch die Substratzugabe verbessert werden, eine weitere Steigerung der Insulinausschüttung ist jedoch nicht meßbar, wenn man die Daten mit den Sekretionskinetiken vergleicht, die man mit Inseln erhält, die mit 5 mM Glukose allein präpariert wurden.

4.3. Einfluß von Pyruvat auf die Insulinsekretion

Der gesteigerte Glukosemetabolismus scheint eine Voraussetzung zur Insulinfreisetzung zu sein und umgekehrt stimuliert eine erhöhte Hormonsekretion diesen Glukosemetabolismus (130). Das Inselgewebe ist in der Lage, bei Bedarf (z.B. bei Blockierung der Glukoseutilisation durch Iodoacetet) auf andere Energiequellen wie etwa Lactat umzuschalten (130). Andere Studien haben ergeben, daß auch Pyruvat allein oder in Kombination mit Lactat (101,103)die nötige Energie liefern kann. Es sollte daher untersucht werden, ob die Inseln die Zugabe von Pyruvat zum Präparationsmedium als zusätzliche Energiequelle nützen können und wie sich diese veränderte Situation in der nachfolgenden Glukose-induzierten Insulinsekretion auswirkt.

Nach der Präparation der Inseln in 5 mM Pyruvat zeigte sich in unseren Experimenten allerdings selbst auf die Stimulation mit 40 mM Glukose mit und ohne Zusatz von 5 mM Pyruvat keine wesentliche Insulinsekretion. Eine Erklärung für diese im Widerspruch zur Literatur stehenden Ergebnisse steht aus.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zum Studium der Glukose-induzierten Insulinsekretion wurde die Perifusionstechnik angewandt. Durch Verbesserung der Oxygenation der Perifusionslösungen sowie Abbau von Druckschwankungen und Verkleinerung des Totvolumens im System sollte eine Optimierung der Methode erzielt werden. Da während der Isolationszeit für die Inseln die Gefahr der Hypoxie besteht, sollte durch Zugabe zum Präparationsmedium von den Energiestoffwechsel verbessernde Substanzen (Glukose, Pyruvat) bzw. durch Erhöhung der cAMP-Konzentration mit Theophyllin versucht werden, eine Verbesserung der Situation zu erreichen.

Die Stimulation mit Glukose ruft bei diesen Experimenten kein biphasisches Insulinsekretionsmuster hervor. Bei Restimulation zeigte sich eine Empfindlichkeitssteigerung der beta-Zellen. Die Präparation der Inseln in niedriger Glukosekonzentration (5 mM) bewirkt ein starkes Ansprechen der beta-Zellen auf die nachfolgende Glukosestimulation, während eine Vorbehandlung in hochkonzentrierter Glukoselösung (40 mM) eine relativ geringe Insulinsekretion zeigt. Die Inkubation der Inseln in Theophyllin bewirkt keine Verbesserung der Glukose-induzierten Insulinausschüttung. Erst bei Zusatz von Theophyllin zum Stimulationsmedium zeigt sich eine Beschleunigung und Erhöhung der Insulinfreisetzung. Die Vorbehandlung der Inseln in Glukose plus Theophyllin führt zu keiner Verbesserung des Sekretionsprofils bei nachfolgender Glukosestimulation. Der Zusatz von Pyruvat zum Präparationsmedium erbringt keine wesentliche Insulinfreisetzung.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Kollagenase-Isolation der Inseln eine möglicherweise erhebliche Alteration der Zellmembranen bewirkt, was eine verminderte Ansprechbarkeit der beta-Zellen auf Glukose zur Folge haben könnte. Die Wirkung von Theophyllin scheint hauptsächlich auf einer Änderung des Adenylatzyklase-Kalzium-Systems in den Inseln zu beruhen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. STEUER, W.:
Sozialhygiene; sozialmedizinische Grundlagen, Gesundheitsfürsorge und -vorsorge.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart,1974

2. LANGERHANS, P.:
Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse (Dissertation).
Berlin 1869

3. MEHRING, von, J. und O.MINKOWSKI:
Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation.
Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. 26 : 371 (1889)

4. LAGUESSE, E.L.:
Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas.
Comt. Rend. Soc. Biol. 5 : 819 (1893)

5. BANTING, F.G. and C.H.BEST:
The internal secretion of the pancreas.
J. Lab. Clin. Med. 7 : 251 (1922)

6. SANGER, F.:
Chemistry of insulin.
Science 129 : 1340 (1959)

7. CERASI, E. and R.LUFT:
Plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus.
Acta endocr. 55 : 278 (1967)

8. DUNN, SHEEHAN, and McLETCHIE:
Experimental alloxan diabetes in rat.
Lancet II : 382 (1943)

9. HELLERSTRÖM, C. and S.E.BROLIN:
Biochemistry and biophysics of insulin secretion.
I.Energy metabolism of the B-cell.
In: Insulin II, edited by A.Hasselblatt und F.von Bruchhausen, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York : 67 (1975)

10. GRODSKY, G.M.:
Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am. J. Physiol. 205 : 638 (1963)

11. ASHCROFT, S.J.H., L.C.C.WEERASINGHE, and P.J.RANDLE:
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132 : 223 (1973)

12. COORE, H.G., P.J.RANDLE, E.SIMON, P.F.KRAICER, and M.C.SHELESNYAK:
Block of insulin secretion by D-Mannoheptulose.
Nature 197 : 1264 (1963)

13. COORE, H.G. and P.J.RANDLE:
Inhibition of glucose phosphorylation by mannoheptulose.
Biochem. J. 91 : 56 (1964)

14. ASHCROFT, S.J.H., C.J.HEDESKOV, and P.J.RANDLE:
Glucose metabolism in pancreatic islets.
Biochem. J. 118 : 143 (1970)

15. MATSCHINSKY, F.M. and J.E.ELLERMAN:
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 243 : 2730 (1968)

16. IDAHL, L.A.:
Dynamics of insulin secretion and glycolysis in isolated pancreatic islets.
Diabetologia 6 : 657 (1970)

17. IDAHL, L.A.:
Dynamics of pancreatic beta-cell response to glucos
Diabetologia 9 : 403 (1973)

18. MATSCHINSKY, F.M., R.LANDGRAF, J.ELLERMAN, and J.KOTLER-BRAJTBURG:
Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans.
Diabetes 21 (Suppl.2) : 555 (1972)

19. LANDGRAF, R., J.KOTLER-BRAJTBURG, and F.M.MATSCHINSKY:
Kinetics of insulin release from the perfused rat pancreas caused by glucose, glucosamine and galactose.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 68 : 536 (1971)

20. ASHCROFT, S.J.H. and J.R.CROSSLEY:
The effects of glucose, n-acetylglucosamine, glyceraldehyde and other sugars on insulin release in vivo.
Diabetologia 11 : 279 (1975)

21. McDANIEL, M.L., S.KING, S.ANDERSON, J.FINK, and P.E.LACY:
Effect of cytochalasin B on hexose transport and glucose metabolism in pancreatic islets.
Diabetologia 10 : 303 (1974)

22. MATSCHINSKY, F.M., J.ELLERMAN, S.STILLINGS, F.RAYBAUD, C.PACE, and W.S.ZAWALICH:
Hexoses and insulin secretion.
In: Insulin II, edited by A.Hasselblatt and F.von Bruchhausen, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York : 106 (1975)

23. MALAISSE-LAGAE, F. and W.J.MALAISSE:
Simulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of 45-calcium by isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88 : 72 (1971)

24. MILNER, R.D.G. and C.N.HALES:
The sodium pump and insulin secretion.
Biochim. Biophys. Acta 135 : 375 (1967)

25. LAMBERT, A.E., B.JEANRENAUD, A.JUNOD, and A.E.RENOLD:
Organ culture of fetal rat pancreas: II. Insulin release induced by amino acids and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 184 : 540 (1969)

26. JUNOD, A., J.LETARTE, A.E.LAMBERT, and W.STAUFFACHER:
Studies in spiny mice: metabolic state and pancraetic insulin release in vitro.
Horm. Metab. Res. 1 : 45 (1969)

27. MILNER, R.D.G. and C.N.HALES:
The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro.
Diabetologia 3 : 47 (1967)

28. CURRY, D.L., L.L.BENNETT, and G.M.GRODSKY:
Requirement for calcium ions in insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214 : 174 (1968)

29. HELLMAN, B., J.O.SEHLIN, and I.-B.TÄLJEDAL:
Calcium-entry by glucose stimulation.
Am. J. Physiol. 221 : 1795 (1971)

30. WOLLHEIM, C.B., B.BLONDEL, P.A.TRUEHEART, A.E.RENOLD, and G.W.G.SHARP:
Calcium-induced insulin release in monolayer culture of the endocrine pancreas.
J. Biol. Chem. 250 : 1354 (1975)

31. ASHBY, J.P. and R.N.SPEAKE:
Insulin and glucagon secretion from isolated islets of Langerhans. The effects of calcium ionophores.
Biochem. J. 150 : 89 (1975)

32. KARL, R.C., W.S.ZAWALICH, J.A.FERRENDELLI, and F.M. MATSCHINSKY:
The role of Ca^{2+} and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in insulin release induced in vitro by the divalent cation ionophore A 23187.
J. Biol. Chem. 250 : 4575 (1975)

33. CHARLES, M.A., J.LAWECKI, R.PICTET, and G.M.GRODSKY:
Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine-3':5'-monophosphate, and calcium.
J. Biol. Chem. 250 : 6134 (1975)

34. CURRY , D.L. and L.L.BENNETT:
Reversal of somatostatin inhibition of insulin secretion by calcium.
Biochem. Biophys. Res. Com. 60 : 1015 (1974)

35. TAMINATO, T., Y.SEINO, Y.GOTO, and H.IMURA:
Interaction of somatostatin and calcium in regulati insulin release from isolated pancreatic islets of rats.
Biochem. Biophys. Res. Com. 66 : 928 (1975)

36. DEVIS, G., G.SOMERS, and W.J.MALAISSE:
Stimulation of insulin release by calcium.
Biochem. Biophys. Res. Com. 67 : 525 (1975)

37. DEVIS, G., G.SOMERS, E.van OBBERGHEN, and W.J.MALAISSE:
Calcium-antagonists and islet function.
I. Inhibition of insulin release by verapamil.
Diabetes 24 : 547 (1975)

38. MALAISSE, W.J.:
Calcium-antagonists and islet function.
V. Effect of R 33711.
Horm. Metab. Res. 8 : 434 (1976)

39. MALAISSE, W.J., G.R.BRISSON, and L.E.BAIRD:
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on 45-Ca efflux from perifused islets.
Am. J. Physiol. 224 : 389 (1973)

40. BRISSON, G.R., F.MALAISSE-LAGAE, and W.J.MALAISSE:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine 3':5'cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51 : 232 (1972)

41. MALAISSE, W.J. and D.G.PIPELEERS:
The role of cations in insulin synthesis and releas
Excerpta Medica Int. Congr. Ser. No. 312 : 95 (1974

42. LACY, P.E., M.M.WALKER, and C.J.FINK:
Perifusion of isolated rat islets in vitro.
Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin.
Diabetes 21 : 987 (1972)

43. LACY, P.E., N.J.KLEIN, and C.J.FINK:
Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perifused rat islets.
Endocrinology 92 : 1458 (1973)

44. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, M.M.WALKER, and P.E. LACY:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system.
Diabetes 20 : 257 (1971)

45. SOMERS, G., E.van OBBERGHEN, G.DEVIS, M.RAVAZZOLA, F.MALAISSE-LAGAE, and W.J.MALAISSE:
Dynamics of insulin release and the microtubular-microfilamentous system. (Effects of colchicine upon glucose-induced insulin secretion.)
Europ. J. Clin. Invest. 4 : 299 (1974)

46. MALAISSE, W.J., E.van OBBERGHEN, G.DEVIS, G.SOMERS, and M.RAVAZZOLA:
Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. (A model for the biphasic release of insulin.)
Europ. J. Clin. Invest. 4 : 313 (1974)

47. RENOLD, A.E.:
Insulin biosynthesis and secretion - a still unsettled topic.
The New England Journal of Medicine 282 : 173 (1970)

48. MALAISSE, W.J., A.HERCHUELZ, J.LEVY, A.SENER, D.G. PIPELEERS, G.DEVIS, G.SOMERS, and E.van OBBERGHEN:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIX. The insulinotropic effect of glyceraldehyde.
Molecular and Cellular Endocrinology 4 : 1 (1976)

49. MALAISSE, W.J., A.HERCHUELZ, J.LEVY, G.SOMERS, G.DEVIS, M.RAVAZZOLA, F.MALAISSE-LAGAE, and L.ORCI:
Insulin release and the movements of calcium in pancreatic islets.
In: Calcium Transport in Contraction and Secretion. Edited by E.CARAFOLI, North Holland Publishing Company : 211 (1975)

50. Van OBBERGHEN, E., G.SOMERS, G.DEVIS, M.RAVAZZOLA, F.MALAISSE-LAGAE, L.ORCI, and W.J.MALAISSE:
Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. VII. Do microfilaments provide the motive force for the translocation and extraction of beta granules?
Diabetes 24 : 892 (1975)

51. MONTAGUE, W., S.L.HOWELL, and I.C.GREEN:
Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans. Identification and characterization of tubulin-like protein.
Biochem. J. 148 : 237 (1975)

52. ORCI, L., K.H.GABBAY, and W.J.MALAISSE:
Pancreatic beta-cell web: its possible role in insulin secretion.
Science 175 : 1128 (1972)

53. MALAISSE, W.J., D.L.HAGER, and L.ORCI:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. IX. The participation of the beta-cell web.
Diabetes 21 : 594 (1972)

54. GABBIANI, G., F.MALAISSE-LAGAE, B.BLONDEL, and L.ORCI:
Actin in pancreatic islets cells.
Endocrinology 95 : 1630 (1974)

55. MALAISSE, W.J.:
Role of cations.
In: Insulin II. Edited by A.HASSELBLATT and F.von BRUCHHAUSEN, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York : 149 (1975)

56. DEAN, P.M., E.K.MATTHEWS, and Y.SAKAMOTO:
Pancreatic islet cells: Effects of monosaccharides glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on the membrane potential and electrical activity.
J. Physiol. 246 : 459 (1975)

57. PACE, C.S., S.N.STILLINGS, B.A.HOVER, and F.M.MATSCHINSKY
Electrical and secretory manifestations of glucose and aminoacid interactions in rat pancreatic islets
Diabetes 24 : 489 (1975)

58. ATWATER, J. and H.P.MEISSNER:
Electrogenic sodium pump in beta-cells of islets of Langerhans.
J. Physiol. 247 : 56 (1975)

59. MONTAGUE, W. and J.R.COOK:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122 : 115 (1971)

60. ZAWALICH, W.S., R.C.KARL, J.A.FERRENDELLI, and F.M. MATSCHINSKY:
Factors governing glucose-induced elevation of cyclic 3'5'AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11 : 231 (1975)

61. GRILL, V. and E.CERASI:
Stimulation by D-glucose of cyclic adenosine 3':5'monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat.
J. Biol. Chem. 249 : 4196 (1974)

62. GRILL, V. and E.CERASI:
Glucose-induced cyclic AMP accumulation in rat islets of Langerhans; preferential effect of the alpha anomer.
FEBS Letters 54 : 80(1975)

63. BASABE, J.C., N.L.LOPEZ, J.K.VIKTORA, and F.W.WOLFF:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas. II. Effect of glucose, glucagon, 3'5'adenosine monophosphate, theophylline, imidazole, and phenoxybenzamine; their interaction with diazoxide.
Diabetes 20 : 457 (1971)

64. SUSSMAN, K.E. and G.D.VAUGHAN:
Insulin release after ACTH, glucagon and cyclic AMP (adenosine 3'5'-phosphate) in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes 16 : 449 (1967)

65. KUO, W.-N., D.S.HODGINS, and J.F.KUO:
Adenylatecyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents.
J. Biol. Chem. 248 : 2705 (1973)

66. GOLDFINE, I.D., R.PELMANN, and J.ROTH:
Inhibition of cyclic 3'-5'-AMP-phosphodiesterase in islet cells and other tissues by tolbutamide.
Nature 234 : 295 (1971)

67. TURTLE, J.R., G.K.LITTLETON, and D.M.KIPNIS:
Stimulation of insulin secretion by theophylline.
Nature 213 : 727 (1967)

68. BOWEN, V. and N.R.LAZARUS:
Glucose mediated insulin release: 3'-5'-AMP-phosphodiesterase.
Diabetes 22 : 738 (1973)

69. SAMS, D.J. and W.MONTAGUE:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release.
Biochem J. 129 : 945 (1972)

70. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, and D.A.MAYHEW:
A possible role for the adenylate cyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46 : 1724 (1967)

71. LAMBERT, A.E., Y.KANAZAWA, I.M.BURR, L.ORCI, and A.E. RENOLD:
On the role of cyclic AMP in insulin release. I. Overall effects in cultured fetal rat pancreas.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 185 : 232 (1971)

72. MALAISSE, W.J., G.BRISSON, and F.MALAISSE- LAGAE:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. I. Interaction of epinephrine and alkaline earth cations.
J. Lab. Clin. Med. 76 : 895 (1970)

73. HELLMAN, B., L.A.IDAHL, A.LERNMARK, and I.-B.TÄLJEDAL:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues:Does cyclic AMP mediate the effect of glucose?
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 : 3405 (1975)

74. CHARLES, M.A., R.FANSKA, F.G.SCHMID, P.H.FORSHAM, and G.M.GRODSKY:
Adenosine 3':5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release.
Science 179 : 569 (1973)

75. GRILL, V. and E.CERASI:
Activation by glucose of adenyl cyclase in pancreati islets of the rat.
FEBS Letters 33 : 311 (1973)

76. EFENDIC, S., V.GRILL, and R.LUFT:
Inhibition by somatostatin of glucose-induced insulinrelease in isolated pancreatic islets of the rat.
FEBS Letters 55 : 131 (1975)

77. MALAISSE , W.J., F.MALAISSE-LAGAE, ans S.KING:
Effects of neutral red and imidazole upon insulin secretion.
Diabetologia 4 : 370 (1968)

78. CAPITO, K. and C.J.HEDESKOV:
Effects of glucose, glucose metabolites and calcium ions on adenylate cyclase activity in homogenates of mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 162 : 569 (1977)

79. MALAISSE, W.J.:
Participation of the adenylate cyclase system.
In: Insulin II, edited by A.HASSELBLATT und F.von BRUCHHAUSEN, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York : 131 (1975)

80. TATSUO TOMITA and D.G.SCARPELLI:
Interaction of cyclic AMP and alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perifused in vitro.
Endocrinology 100 : 1327 (1977)

81. WILLIAMS, R.H (edit.):
Textbook of Endocrinology, 1974.

82. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, and P.H.WHRIGHT:
A new method for the measurement in vitro of pancreatic insulin secretion.
Endocrinology 80 : 99 (1967)

83. SUSSMAN, K.E., G.D.VAUGHAN, and R.F.TIMMER:
An in vitro method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.
Metabolism 15 : 466 (1966)

84. LAZAROW, A.:
Studies on the isolated islet tissue of fish.
Biol. Bull. 113 : 414 (1957)

85. HELLERSTRÖM, C.:
A method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals.
Acta endocr. (Kbh.) 45 : 122 (1964)

86. MOSKALEWSKI, S.:
Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.
Gen. Comp. Endocr. 5 : 342 (1965)

87. LANDGRAF, R.:
Untersuchungen über Kinetik und Steuerungsmechanismen der Insulinsekretion.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.

88. SODOYEZ, J.C., F.SODOYEZ-GOFFAUX, and P.P.FOA:
Evidence for an insulin-induced inhibition of insulin release by isolated islets of Langerhans.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 130 : 568 (1969)

89. LANDGRAF-LEURS, M.M.C., R.LANDGRAF, R.DAFFNER, and R.HÖRL:
The stimulatory and inhibitory function of theophylline on amino-acid-induced insulin release: Studies with the perfused rat pancreas.
Endocrinology 97 : 1416 (1975)

90. BURR, I.M., W.STAUFFACHER, L.BALANT, and A.E.RENOLD:
Regulation of insulin release in perifused pancreatic tissue.
Act. diabet. lat. VI (Suppl.I) : 580 (1969)

91. LACY, P.E. and M.KOSTIANOVSKY:
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16 : 35 (1967)

92. MITSURU HOSHI and W.W.SHREEVE:
Release and production of insulin by isolated, perifused rat pancreatic islets, control by glucose.
Diabetes 22 : 16 (1973)

93. ATSUMI SHIBATA, C.W.LUDVIGSEN, S.P.NABER, M.L.McDANIEL, and P.E.LACY:
Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets.
Diabetes 25 : 667 (1976)

94. IDAHL, L.A.:
A microperifusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediate metabolites and insulin release.
Analyt. Biochem. 50 : 386 (1972)

95. LACY, P.E.:
Long-term perifusion of isolated rat islets in vitro.
Diabetes 25 : 484 (1976)

96. HUDSON, M.V. and L.V.BECK:
System for perfusing isolated islets of Langerhan effects of change in glucose concentration on insulin release.
Diabetes 18 : 359 (1969)

97. HALES, C.N. and P.J.RANDLE:
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate.
Biochem.J. 88 : 137 (1963)

98. BOTTERMANN, P., R.ERMLER, and J.HENNER:
A semiautomatic method for immunoassay for insuli and hGH.
Horm. Metab. Res. 3 : 55 (1971)

99. MARSCHNER, I., F.ERHARDT, and P.C.SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard curv by "spline function".
Int. Atom. Energ. Ag. 1 : 111 (1974)

100. NORFLEET, W.T., A.S.PAGLIARA, M.W.HAYMOND, and F.M. MATSCHINSKY:
Comparison of alpha- and beta-cell secretory responses in islets isolated with collagenase and in the isolated perfused pancreas of rats.
Diabetes 24 : 961 (1975)

101. PACE, C.S., S.N.STILLINGS, B.A.HOVER, and F.M. MATSCHINSKY:
Electrical and secretory manifestations of glucos and aminoacid interactions in rat pancreatic isle
Diabetes 24 : 489 (1975)

102. BRISSON, G.R. and W.J.MALAISSE:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induce insulin release. XI. Effects of theophylline and epinephrine on 45-Ca efflux from perifused islets
Metabolism 22 : 455 (1973)

103. MATSCHINSKY, F.M. and J.ELLERMAN:
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Res. Com. 50 : 193 (1973)

104. GRODSKY, G.M.:
Secretion of insulin. A. The kinetics of insulin release.
In: Insulin II, edited by A.HASSELBLATT and F.von BRUCHHAUSEN, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York : 1 (1975)

105. GRODSKY, G.M.:
A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling.
J. Clin. Invest. 51 : 2047 (1972)

106. LAMBERT, A.E., A.JUNOD, W.STAUFFACHER, B.JEANRENAUD, and A.E.RENOLD:
Organ culture of fetal rat pancreas.
I. Insulin release induced by caffeine and by sugars and some derivatives.
Biochim. Biophys. Acta 184 : 529 (1969)

108. CURRY, D.L., L.L.BENNETT, and G.M.GRODSKY:
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocrinology 83 : 572 (1968)

109. GRODSKY, G.M., H.LANDAHL, D.L.CURRY, and L.L.BENNETT:
In vitro studies suggesting a two-compartemental model for insulin secretion.
In: Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets, edited by S.FALKMER, B.HELLMAN and I.-B. TÄLJEDAL, Oxford, Pergamon Press : 409 (1970)

110. STEINER, O.F.:
Proinsulin and insulin biosynthesis.
Acta. diabet. lat. 6 (Suppl. I) : 453 (1969)

111. TAYLOR, K.W. and W.MONTAGUE:
The synthesis, storage and release of insulin.
Nobel Symp. 13 : 123 (1970)

112. MATTHEWS, E.K. and P.M.DEAN:
Electrical activity in islet cells.
In: The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets, edited by S.FALKMER, B.HELLMAN, and I.-B. TÄLJEDAL, Oxford, Pergamon Press :305 (1970)

113. IVERSEN, J. and D.W.MILES:
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated perfused canine pancreas.
Diabetes 20 : 1 (1971)

114. HENQUIN, J.-C.:
Relative importance of extracellular and intracell
calcium for the two phases of glucose-stimulated
insulin release: studies with theophylline.
Endocrinology 102 : 723 (1978)

115. ANDERSON, A., J.WESTMAN, C.HELLERSTRÖM:
Effects of glucose on the ultrastructure and insul
biosynthesis of isolated mouse pancreatic islets
maintained in tissue culture.
Diabetologia 10 : 743 (1974)

116. ZIEGLER, B., H.J.HAHN, G.A.SPECK, and M.ZIEGLER:
Untersuchungen an Langerhansschen Inseln in vitro.
XI. Insulinsekretion und Insulingehalt isolierter
Langerhansscher Inseln der Wistar-Ratte in Kurzzei
inkubation und unter Organkulturbedingungen.
Endokrinologie 64 :269 (1975)

117. MALDONATO, A., A.E.RENOLD, G.W.G.SHARP, and E.CERASI:
Glucose-induced proinsulin biosynthesis. Role of
islet cyclic AMP.
Diabetes 26 : 538 (1977)

118. LAMBERT, A.E., J.C.HENQUIN, L.ORCI, and A.E.RENOLD:
Enzyme-induced modifications of beta-cell function
I. Effect of pronase on insulin secretion.
Europ. J. Clin. Invest. 4 : 459 (1974)

119. FRANKEL, B.J., J.A.KROMHOUT, W.IMAGAWA, H.D.LANDAHL, and
G.M.GRODSKY:
Glucose-stimulated ^{45}calcium uptake in isolated ra
islets.
Diabetes 27 : 365 (1978)

120. LEMAY, L.T., A.LEMAY, and P.E.LACY:
Somatostatin inhibition of insulin release from
freshly isolated and organ cultured rat islets of
Langerhans in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Com. 63 : 1130 (1975)

121. WOLLHEIM, C.B. and G.W.G.SHARP:
Stimulatory and inhibitory effects of epinephrine
on islet Ca^{++}uptake and insulin release.
Diabetologia 14 : 282 (1978)

122. FRANKEL, B.J., E.GYLFE, B.HELLMAN, and L.-A.IDAHL:
Maintenance of insulin release from pancreatic
islets stored in the cold for up to 5 weeks.
J. Clin. Invest. 57 : 47 (1976)

123. NABER, S.P., M.L.McDANIEL, and P.E.LACY:
The effect of glucose on the acute uptake of
calcium-45 in isolated rat islets.
Endocrinology 101 : 686 (1977)

124. HELLMAN, B. and E.GYLFE:
Calcium and pancreatic beta-cell function: Glucose stimulation of uptake of lanthanum-displaceable 45-calcium from low or normal calcium-containing media.
Horm. Metabol. Res. 10 : 29 (1978)

125. HELLMAN, B., J.SEHLIN, and I.-B.TÄLJEDAL:
Calcium and secretion : distinction between two pools of glucose-sensitive calcium in pancreatic islets.
Science 194 : 1421 (1976)

126. RASMUSSEN, H.:
Ionic and hormonal control of calcium homeostasis.
Am. J. Med. 50 : 567 (1971)

127. SEHLIN, J.:
Calcium uptake by subcellular fraction of pancreatic islets. Effects of nucleotides and theophylline.
Biochem. J. 156 : 63 (1976)

128. FORMBY, B., K.CAPITO, J.EGEBERG, and C.J.HEDESKOV:
Ca-activated ATPase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 230 : 441 (1976)

129. BURR, I.M., Y.KANAZAWA, E.B.MARLISS, and A.E.LAMBERT:
Biphasic insulin release from perifused cultured fetal rat pancreas.
Diabetes 20 : 592 (1971)

130. PACE, C.S., J.ELLERMAN, B.A.HOVER, S.N.STILLINGS, and F.M.MATSCHINSKY:
Multiple metabolic functions of glucose in rat pancreatic islets.
Diabetes 24 : 476 (1975)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz.Dr. R.Landgraf für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof.Dr. E.Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof.Dr. P.C.Scriba und Frau Dr. M.Landgraf-Leurs möchte ich für die freundliche Unterstützung und nützliche Hinweise bei der Durchführung der Arbeit danken.

Meinem Kollegen Dr. A.Witte, mit dem ich den methodischen Teil dieser Arbeit gemeinsam durchführte, danke ich für die gute Kooperation.

Frau R.Sieber gebührt für ihre stets tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft besonderer Dank.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. I.Marschner für die Erstellung eines Computer-Programms, Frau Wiktorin für die Durchführung der technischen Zeichnungen und Fräulein Haag für die photografischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 20.3.1952 wurde ich als einziges Kind des Finanzbeamten Siegfried Kramer und seiner Ehefrau Margarete, geb. Riederer, in Neuburg/Donau geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich in Neuburg die Volksschule und trat anschließend in das dortige Descartes-Gymnasium ein. Im Juni 1971 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1971 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Humanmedizin. Das Physikum bestand ich im Oktober 1973. Im August 1974 folgte der erste, im August 1976 der zweite Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Anschließend absolvierte ich in München das Praktische Jahr in der II. Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing, an der Dermatologischen Universitätsklinik und der Medizinischen Universitätsklinik Innenstadt. Mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung schloß ich im Oktober 1977 mein Studium ab.

Von November 1974 bis Dezember 1976 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit.

Seit September 1976 bin ich mit dem Diplomphysiker Andreas Magerl verheiratet und wir haben eine Tochter.